

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 18 de noviembre de 1987

por la que se adapta al progreso técnico, por novena vez, la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas

(87/302/CEE)

LA COMISION DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas ⁽¹⁾, modificada por sexta vez por la Directiva 79/831/CEE ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 19,

Considerando que el apartado 1 del artículo 3 de la Directiva 67/548/CEE establece que las propiedades físico-químicas, toxicidad y ecotoxicidad de las sustancias y preparados se determinarán según los métodos previstos en el Anexo V;

Considerando que el apartado 2 del artículo 3 de la Directiva 67/548/CEE establece que la evaluación del peligro para el medio ambiente, incluso en forma potencial, de una sustancia o preparado se efectuará en función de las características consignadas en los Anexos VII y VIII;

Considerando el Anexo V, en la redacción dada al mismo por la Directiva 84/449/CEE de la Comisión ⁽³⁾, correspondiente a las características consignadas en el Anexo VII y que es necesario describir también métodos de ensayo correspondientes a las características consignadas en el Anexo VIII;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité para la adaptación

al progreso técnico de las Directivas relativas a la eliminación de obstáculos técnicos al comercio de sustancias y preparados peligrosos,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Al Anexo V de la Directiva 67/548/CEE se añadirá el texto del Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán y publicarán, antes del 31 de diciembre de 1988, las disposiciones necesarias para cumplir la presente Directiva e informarán inmediatamente de ello a la Comisión. Aplicarán dichas medidas, a más tardar, el 30 de junio de 1989.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecha en Bruselas, el 18 de noviembre de 1987.

Por la Comisión

S. CLINTON DAVIS

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO n° 196 de 16. 8. 1967, p. 1.

⁽²⁾ DO n° L 259 de 15. 10. 1979, p. 10.

⁽³⁾ DO n° L 251 de 19. 9. 1984, p. 1.

ANEXO

Los métodos de ensayo que se describen aquí se destinan a la determinación de algunas de las propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas detalladas en el Anexo VIII de la Directiva 79/831/CEE del Consejo. Se describen métodos de ensayo apropiados al nivel 1 y al nivel 2 del Anexo VIII, pero los ensayos no están subdivididos en función de los diferentes niveles.

ÍNDICE

	Página
PARTE B: Métodos para la determinación de la toxicidad	4
Introducción general: Parte B	4
Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores	8
Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores	12
Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores	16
Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores	20
Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores	24
Ensayo de toxicidad crónica	27
Ensayo de carcinogénesis	32
Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis	37
Ensayo de reproducción en una generación	43
Ensayo de reproducción en dos generaciones	47
Toxicocinética	51
Ensayos de mutagénesis y detección de carcinogénesis:	55
— Mutación génica, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
— Recombinación mitótica, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
— Mutación génica de células de mamíferos <i>in vitro</i>	61
— Lesión y reparación de DNA — síntesis de DNA no programada — células de mamífero <i>in vitro</i> ..	64
— Ensayo <i>in vitro</i> de intercambio de cromátidas hermanas	68
— Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i>	71
— Ensayo de transformación de células de mamífero <i>in vitro</i>	73
— Ensayo de letalidad dominante en roedores	76
— Ensayo citogenético de células embrionarias de mamífero <i>in vivo</i>	79
— Ensayo de la mancha en el ratón	82
— Translocación hereditaria en el ratón	85
PARTE C: Métodos para la determinación de la ecotoxicidad	88
Introducción general: Parte C	88
Ensayo de inhibición del crecimiento de algas	89
Toxicidad para gusanos de tierra: Ensayo con suelo artificial	95
Biodegradación: Prueba Zahn-Wellens	99
Biodegradación: Ensayo de simulación con lodo activado	106
Biodegradación: Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración	118
Biodegradación: Prueba LASC modificada	123

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE B

ESTUDIOS A LARGO PLAZO

Estudios subcrónicos, crónicos y de carcinogénesis

Caracterización de la sustancia en estudio y de la mezcla empleada para el tratamiento

Antes de iniciar cualquier estudio de toxicidad, es preciso conocer la composición de la sustancia objeto de estudio, incluidas las impurezas de importancia, y sus propiedades fisicoquímicas destacadas, como la estabilidad.

Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia estudiada aportan información importante para la selección de la vía de administración, el diseño de los estudios subcrónicos, crónicos o de carcinogénesis y la manipulación y el almacenamiento del material.

Asimismo, la información sobre la estructura química y las propiedades fisicoquímicas puede dar una idea de las características de absorción por la vía de administración propuesta, y de las posibilidades de distribución metabólica e hística. También es posible que se disponga de información sobre parámetros toxicocinéticos, procedente de estudios de toxicidad y toxicocinéticos previos.

El comienzo del estudio debe ir precedido del desarrollo de un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sustancia estudiada — incluidas las impurezas principales, si es posible — en el vehículo de administración y en el material biológico.

Animales de experimentación: selección de especie y cepa

Debido a la necesidad de tratar a los animales durante una parte importante de su existencia, los estudios suelen limitarse a especies fáciles de mantener y de vida relativamente corta. Es muy deseable el conocimiento de la incidencia de enfermedades y tumores espontáneos en la cepa utilizada cuando se mantienen condiciones similares.

Las cepas deben estar perfectamente caracterizadas y carecer de defectos congénitos perturbadores. El empleo de cepas consanguíneas, o híbridos F1, tiene ciertas ventajas a este respecto, pero si se dispone de datos suficientes sobre los antecedentes de cepas no consanguíneas, utilizando animales procedentes de colonias cerradas, puede recurrirse a ellas.

Cuidado de los animales, alimentación y bebida

Las pruebas y estudios con animales deben realizarse de acuerdo con la normativa nacional y tener en cuenta principios humanitarios y los últimos progresos en el campo de la protección animal.

Para obtener resultados significativos son imprescindibles un control estricto de las condiciones ambientales y unas técnicas adecuadas de manipulación de animales. Factores como el alojamiento, las enfermedades intercurrentes, la farmacoterapia, las impurezas en la alimentación, el aire, el agua y la cama, los cuidados generales de los animales y las instalaciones, pueden influir en gran medida en el resultado de estudios con dosis repetidas. En general, debe conocerse el efecto de los esterilizantes químicos en el estudio.

La alimentación debe satisfacer todas las necesidades nutritivas de la especie estudiada y carecer de impurezas que puedan influir en el resultado de la prueba. Los roedores recibirán alimentos y agua *ad libitum*; el alimento se cambiará al menos semanalmente. En la actualidad se utilizan tres tipos de alimentación: convencional, sintética y dietas diversas de fórmula libre.

Sea cual sea la alimentación elegida, los proveedores deben determinar, mediante controles periódicos, el valor nutritivo y el nivel de contaminantes de la alimentación básica, y facilitar la información así obtenida al laboratorio con cada lote de producto. Es muy conveniente el conocimiento de los efectos del régimen alimenticio sobre el metabolismo, así como sobre el desarrollo de tumores y la longevidad de los animales.

Además, el laboratorio que haga la prueba puede practicar un contraanálisis de la alimentación básica para controlar los componentes alimenticios y los contaminantes involuntarios, incluidos los agentes cancerígenos. Si se hace así, los resultados de los análisis han de conservarse e incluirse en el informe final sobre cada sustancia estudiada.

No deben estar presentes componentes habituales de la alimentación que se sabe influyen en la carcinogénesis (por ejemplo, antioxidantes, ácidos grasos insaturados, selenio) en concentraciones perturbadoras. La posible influencia de varios contaminantes alimenticios comunes en la evaluación de la cancerogenicidad obliga a prestar una atención especial a la presencia en la alimentación de residuos de plaguicidas, compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, estrógenos, metales pesados, nitrosaminas y micotoxinas.

Cuando la sustancia estudiada se administre en el agua o el alimento, son esenciales las pruebas de estabilidad. Han de practicarse pruebas de estabilidad y homogeneidad debidamente realizadas para establecer la frecuencia de preparación y control de la alimentación necesaria.

Si se esteriliza la alimentación, deben conocerse los efectos de las técnicas empleadas sobre la sustancia estudiada y sobre los componentes alimenticios. Se practicarán los ajustes que procedan.

Durante las pruebas de cancerogenicidad, los investigadores deben ser conscientes de la posible contaminación del agua empleada. El agua apta para el consumo humano es, por lo general, satisfactoria, y debe disponerse de información sobre su composición.

Es posible que, a medida que crezcan los animales, sea preciso ajustar la concentración de una sustancia estudiada en la alimentación para mantener una ingestión razonablemente constante de ella en relación con el peso corporal.

Ha de lograrse que los valores nutritivos de las alimentaciones de control y de prueba sean lo más parecidos posible. En consecuencia, hay que tener en cuenta el valor nutritivo de una sustancia de prueba incorporada a la alimentación. La experiencia indica que es improbable que una concentración de hasta un 5 % de sustancias de prueba no nutritivas en la alimentación, altere en grado significativo el valor nutritivo de ésta.

1. Estudios por inhalación

No se especifica prueba límite alguna, ya que no ha sido posible definir un valor de exposición límite por inhalación único.

2. Estudio de teratogenicidad

El método de prueba se basa fundamentalmente en la administración por vía oral. Es posible utilizar otras vías según las propiedades físicas de la sustancia objeto de estudio, o de la vía probable de exposición humana. En tales casos, el método de prueba debe adaptarse teniendo en cuenta la información obtenida de la prueba de 28 días.

3. Toxicocinética

Los estudios toxicocinéticos ayudan a interpretar y evaluar los datos de toxicidad. Estos estudios van encaminados a aclarar aspectos determinados de la toxicidad de la sustancia química objeto de estudio, y sus resultados pueden ayudar a idear estudios de toxicidad ulteriores. No se contempla la necesidad de determinar en cada caso todos los parámetros. Sólo en casos esporádicos será precisa la totalidad de los estudios toxicocinéticos (absorción, excreción, distribución y metabolismo). En el caso de compuestos determinados, tal vez sean oportunos cambios de la secuencia de los estudios, o baste un estudio de dosis única.

Definiciones

- Toxicocinética: Estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de sustancias de prueba.
- Absorción: Proceso o procesos por los que penetra en el organismo una sustancia administrada.
- Excreción: Proceso o procesos por los que se eliminan del organismo la sustancia administrada, sus metabolitos o ambos.
- Distribución: Proceso o procesos por los que la sustancia absorbida, sus metabolitos o ambos, se reparten por el interior del organismo.
- Metabolismo: Proceso o procesos por los que la sustancia administrada se modifica estructuralmente en el organismo por medio de reacciones enzimáticas o no enzimáticas.

4. Estudio agudo y subagudo en una segunda especie

El objeto de un estudio en una segunda especie es complementar las conclusiones extraídas en la primera.

Si se practica un estudio en una segunda especie, el método de prueba ya descrito puede utilizarse o adaptarse para un número menor de animales.

5. Estudios de fertilidad

Cuando sea necesaria una prueba de reproducción en tres generaciones, cabe ampliar el método descrito para la prueba de reproducción en dos generaciones, a fin de cubrir la tercera.

6. Estudios de mutagénesis

Pruebas de mutagénesis complementarias, incluidas pruebas de detección de la carcinogénesis

En el Anexo VIII de la Directiva se citan estudios complementarios para determinar la mutagénesis o la carcinogénesis. Los estudios descritos en esta sección pueden utilizarse en general para investigar ambas cosas.

Introducción

La evaluación inicial de la actividad mutágena de una sustancia comprende pruebas encaminadas a descubrir mutaciones génicas (puntuales) en las bacterias, así como lesiones citogenéticas en células de mamíferos (*in vitro* o *in vivo*); se han descrito anteriormente métodos adecuados para estos estudios «de base». Esta sección se ocupa de estudios complementarios que permiten comprobar o ampliar los resultados obtenidos en las pruebas de base y que pueden emplearse con varios fines:

1. confirmar los resultados obtenidos en las pruebas de base;
2. investigar objetivos no perseguidos en aquéllas;
3. iniciar o ampliar estudios *in vivo*.

Con estos fines, la gama de pruebas descritas comprende sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*, así como una amplia variedad de finalidades biológicas. Las pruebas aportan información sobre mutaciones puntuales en organismos más complejos que las bacterias empleadas en las pruebas de base y amplían la información sobre la capacidad de una sustancia para inducir aberraciones cromosómicas.

También se describen pruebas con finalidades distintas de las mutaciones puntuales y las aberraciones cromosómicas, que facilitan información complementaria y, si procede, pueden utilizarse en programas de experimentación.

Por norma general, si se considera la aplicación de un programa de estudios complementarios de mutagénesis, debe organizarse de forma que aporte información añadida pertinente sobre el potencial mutágeno o cancerígeno de la sustancia.

La elección de los estudios oportunos en un caso concreto dependerá de numerosos factores, como son las características químicas y físicas de la sustancia, los resultados de las pruebas bacterianas y citogenéticas iniciales, el perfil metabólico de la sustancia, los resultados de otros estudios de toxicidad y los usos conocidos de la sustancia. En consecuencia, y dada la diversidad de factores que deben tenerse en cuenta, no es oportuno un programa rígido de selección de las pruebas. No obstante, pueden servir de orientación ciertos principios generales. Así, cuando una de las pruebas de base haya sido positiva, los estudios complementarios deben incluir al menos una prueba capaz de descubrir la misma finalidad genética. Si las dos pruebas de base han dado resultado negativo, deben practicarse normalmente, como estudios complementarios, una prueba de mutaciones génicas y otra encaminada a descubrir aberraciones cromosómicas. Quizá sea apropiado obtener también datos complementarios de las pruebas indicadoras (antes enumeradas).

A continuación se agrupan los métodos empleados para tales investigaciones según su finalidad genética principal.

Estudios de investigación de mutaciones génicas (puntuales)

Para la investigación ulterior de la capacidad de una sustancia de producir mutaciones génicas (puntuales), pueden ser apropiadas cualquiera de las pruebas siguientes:

- a) Estudios de mutación directa o inversa con microorganismos eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*).
- b) Estudios *in vitro* para descubrir mutaciones directas en células de mamífero.
- c) Prueba del gen letal recesivo ligado al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- d) Prueba de mutación somática *in vivo*: prueba de la mancha en el ratón.

Estudios de investigación de aberraciones cromosómicas

Para la investigación ulterior de la capacidad de una sustancia de producir aberraciones cromosómicas, pueden ser apropiadas cualquiera de las pruebas siguientes:

- a) Estudios citogenéticos *in vivo* en mamíferos.

Si no se ha incluido en la evaluación inicial (estudios de base), debe considerarse el uso del análisis *in vivo* de la metafase de células de la médula ósea. Además, puede estudiarse la citogenética de las células embrionarias *in vivo*.

- b) Estudios citogenéticos *in vitro* de células de mamífero, si no se han incluido en la evaluación inicial.
- c) Gen letal dominante en roedores.
- d) Prueba de translocación hereditaria en el ratón.

Pruebas indicadoras de efectos en el DNA

Se dispone de métodos que indican determinados efectos en el DNA pero cuya finalidad no es una manifestación mutágena. Estos estudios pueden aportar información complementaria de la obtenida en los estudios de mutagénesis, y posiblemente útil para interpretar éstos. Si se precisaran estas investigaciones, puede ser apropiado cualquiera de los métodos siguientes, que emplean microorganismos eucariotas o células de mamífero:

- a) Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- b) Lesión y reparación del DNA — síntesis de DNA no programada — células de mamífero (*in vitro*).
- c) Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero (*in vitro*).

Otras pruebas indicadoras de potencial carcinógeno

Hay disponibles ensayos de transformación de células de mamífero que determinan la capacidad de una sustancia para inducir en un cultivo celular alteraciones morfológicas y de comportamiento, que se consideran relacionadas con una transformación maligna *in vivo*. Pueden utilizarse varios tipos celulares y criterios de transformación diferentes.

Evaluación del riesgo de efectos hereditarios en mamíferos

Existen métodos para determinar los efectos hereditarios en mamíferos producidos por mutaciones génicas (puntuales) [prueba del locus específico en el ratón ⁽¹⁾] o por aberraciones cromosómicas (prueba de translocación hereditaria en el ratón). Estos métodos pueden emplearse cuando se valore el riesgo genético de una sustancia para el ser humano. No obstante, habida cuenta de la complejidad de estas pruebas y del enorme número de animales necesarios, sobre todo para la prueba del locus específico, estos estudios deben estar completamente justificados.

⁽¹⁾ La prueba del locus específico en el ratón (no descrita en este documento) puede usarse para determinar la mutación sufrida por células embrionarias en la primera generación tras exposición a una sustancia mutágena. Es posible apreciar y cuantificar las alteraciones genéticas generadoras de modificaciones de los productos génicos y expresadas en fonotipos visibles.

TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administran a diario, por vía oral, dosis crecientes de la sustancia estudiada a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterio cualitativo

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada puede administrarse en la dieta, por alimentación forzada, en cápsulas o en el agua de bebida. Todos los animales deben recibirla por el mismo método durante todo el período de experimentación. Si se emplean un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, no deben tener efectos tóxicos. En caso necesario, pueden utilizarse datos publicados.

*Condiciones del ensayo**Animales de experimentación*

Salvo indicación en contrario, la especie preferible es la rata. Han de utilizarse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio habituales, y la administración se iniciará de preferencia antes de que las ratas tengan 6 semanas de vida, y en todo caso no después de haber cumplido las 8. Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica se utilizarán en ambos las mismas especies y cepas.

Número y sexo

Cada dosis ha de administrarse al menos a 20 animales (10 hembras y 10 machos). Las hembras deben ser nulíparas y no estar preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días y observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, los controles deben recibir el vehículo del mismo modo que los grupos tratados, y en igual cantidad que la suministrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados.

En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la incidencia de mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Cuando se administre la sustancia estudiada en la alimentación, pueden emplearse una concentración alimenticia constante (ppm o mg/kg de alimento) o una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe especificarse la opción escogida. Si se administra la sustancia por alimentación forzada, la dosis ha de darse a la misma hora todos los días. Las dosis se ajustarán a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantengan a un nivel constante en relación con el peso del animal.

Prueba de límite

Si una prueba de 90 días de duración, realizada de acuerdo con el método descrito con una dosis de 1 000 mg/kg de peso/día, o con una dosis superior en función de una posible exposición humana (siempre que se conozca ésta), no provoca indicio alguno de un efecto tóxico, puede no considerarse necesaria la realización de pruebas ulteriores. Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante asegurarse de que, cuando se administran en la alimentación, las cantidades y otras propiedades de la sustancia objeto de estudio no alteran las necesidades nutritivas normales.

Período de observación

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

El régimen ideal comprende la administración de la sustancia ensayada a los animales los 7 días de la semana durante un período de 90 días. Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben conservarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia.

Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autónomo y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento (y de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) y el peso de los animales.

Es necesaria la observación periódica de los animales para evitar en lo posible la pérdida de animales de la prueba por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes del grupo de tratamiento no satélite. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican comúnmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, hay que examinar a todos los animales.
- b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento leucocitario total y diferencial y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de

la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y glutamicooxaloacética ⁽²⁾ séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, hay que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado, para un posible examen histopatológico posterior, los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, tráquea y pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglios linfáticos representativos, (glándula mamaria femenina), (músculatura del muslo), nervios periféricos, esternón con médula ósea, (ojos), (fémur, incluida la superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

- a) Se someterán a un examen histopatológico completo los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.
- c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.
- d) Se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico, en busca de signos de infección ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. También debe considerarse la posibilidad de practicar exámenes histopatológicos del hígado y los riñones de estos grupos. Es posible que en estos animales no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.
- e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba
- dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA
ENSAYO DE 90 DÍAS EN NO ROEDORES

1. MÉTODO

1.2. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administran a diario, por vía oral, dosis crecientes de la sustancia estudiada a varios grupos de animales de experimentación (no roedores), a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran durante la prueba se someterán a autopsia, que se practicará también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterio cualitativo

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada puede administrarse en la alimentación, o quizá se considere más conveniente darla en cápsulas. Cabe utilizar otros métodos de administración oral. Todos los animales deben recibirla por el mismo método durante todo el período de experimentación. Si se emplea un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, deberá conocerse que carecen de efectos tóxicos. En caso necesario, pueden utilizarse datos publicados.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

La especie de uso común es el perro, preferiblemente de raza definida, pero pueden emplearse otras. Se utilizarán animales jóvenes y sanos y, en el caso del perro, la administración se iniciará preferiblemente a los 4-6 meses de edad, y no después de los 9 meses. Cuando se realice una prueba oral subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie/raza.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 8 animales (4 hembras y 4 machos) para cada dosis. El número de animales al final del estudio será suficiente para permitir una evaluación significativa de los efectos tóxicos.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Los animales del grupo de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. La dosis máxima originará efectos tóxicos, pero no fallecimientos. La dosis más baja no provocará signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación

válida de la exposición humana, la dosis será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis intermedia produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados.

En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, no deben producirse fallecimientos.

Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante cerciorarse de que las cantidades que de ellas se administren con la alimentación no obstaculizarán la nutrición normal.

Cuando se administre la sustancia estudiada con la alimentación, puede emplearse una concentración alimenticia constante (ppm o mg/kg de alimento) o una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe especificarse la opción escogida. Si se administra la dosis directamente, por ejemplo en cápsulas, ha de darse a las mismas horas todos los días, y se ajustará según sea necesario a intervalos semanales para mantener un nivel constante en relación con el peso del animal. Si se emplea una prueba subcrónica con carácter preliminar a una crónica, debe emplearse, por lo general, un régimen alimenticio similar en ambos estudios.

Prueba de límite

Si una prueba de 90 días de duración, realizada según el método descrito con una dosis de 1 000 mg/kg de peso/día, o con una dosis superior en función de una posible exposición humana (cuando se conozca ésta), no provoca indicio alguno de efecto tóxico, puede no considerarse necesaria la realización de pruebas ulteriores. Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante asegurarse de que, cuando se administran en la alimentación, las cantidades y otras propiedades de la sustancia objeto de estudio no alteran las necesidades nutritivas normales.

Período de observación

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

El régimen ideal comprende la administración a los animales de la sustancia ensayada, los 7 días de la semana durante un período de 90 días. No obstante, y en razón fundamentalmente de consideraciones prácticas, cuando se administre la sustancia por un medio distinto de la alimentación, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Entre las observaciones deben figurar (aunque no de modo exclusivo) las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento (y de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) y el peso de los animales.

Se procederá a diario a un examen clínico detenido de los animales, y se adoptarán medidas apropiadas para reducir al mínimo la pérdida de los animales estudiados. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los animales supervivientes. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia. En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaban alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.
- b) Pruebas hematológicas, realizadas al principio a intervalos mensuales o a la mitad del período de estudio y, por último, al final de éste: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento leucocitario total y diferencial, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre, al principio, a intervalos mensuales o a la mitad del período de estudio y, por último, al final de éste. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepática y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a la especie/raza), transaminasas glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y glutamicooxaloacética ⁽²⁾ sérica, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea necesario, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados. Los no roedores se someterán a un período de ayuno (no superior a 24 horas) antes de obtener muestras de sangre.

- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo cuando esté indicado por efectos tóxicos probables o manifiestos.

Autopsia

Debe practicarse en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales, tiroides (con paratiroides) y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación.

Se conservarán en un medio adecuado para su posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, glándulas salivales, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), vesícula biliar, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (músculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), esternón con médula ósea, (fémur, incluida superficie articular) y (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

Se someterán a un examen histopatológico completo los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima. En los demás grupos tratados, se practicarán exámenes histopatológicos de los órganos que presenten lesiones en el grupo con la dosis máxima, o cuando las observaciones clínicas así lo aconsejen.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que muestran lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- raza o cepa de la especie, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba
- dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo (con atención especial a los hallazgos clínicos)
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos

- pruebas hematológicas prácticas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleada y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados cuando proceda
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO**1.1. Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se aplican a diario dosis crecientes de la sustancia estudiada en la piel de animales de experimentación integrados en varios grupos, a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método*Preparativos*

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Antes de proceder a la aplicación, se elimina el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Puede emplearse afeitado, pero deberá practicarse aproximadamente 24 horas antes de la prueba. Suelen ser necesarios cortes o afeitados reiterados del pelo, más o menos a intervalos semanales. Al practicarlos, hay que cuidar de no lesionar la piel. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia en estudio, una superficie no inferior al 10 % de la corporal. Para decidir la zona que debe despejarse y las dimensiones de la superficie a tratar, se tendrá en cuenta el peso del animal. Cuando se prueben sólidos, que pueden pulverizarse si se considera oportuno, se humedecerá lo suficiente la sustancia estudiada con agua o, en caso necesario, un vehículo apropiado para garantizar un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se emplean por lo general sin diluir. Se practican aplicaciones diarias 5 ó 7 días a la semana.

*Condiciones del ensayo***Animales de experimentación**

Pueden emplearse ratas, conejos o cobayas adultos. Es posible emplear otras especies, pero su uso exigirá justificación. Al principio de la prueba, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del peso medio.

Cuando se realice una prueba dérmica subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) con piel sana para cada dosis. Las hembras serán nulpáras y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos y un control, o un control para el vehículo si se emplea éste. El período de exposición no será inferior a 6 horas diarias. La aplicación de la sustancia de prueba debe hacerse a las mismas horas todos los días, y la cantidad del producto se ajustará a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantenga una dosis constante en relación con el peso del animal. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, el grupo de control lo recibirá de igual modo que los grupos tratados, y en cantidad igual a la administrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a ese valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Si la aplicación de la sustancia probada provoca una irritación cutánea grave, se reducirán las concentraciones, lo que quizá origine una reducción, o la ausencia, de otros efectos tóxicos con la dosis alta. Si la piel ha sufrido lesiones importantes, quizá sea necesario dar por concluido el estudio y emprender uno nuevo a concentraciones menores.

Prueba de límite

Si una experiencia previa realizada con una dosis de 1 000 mg/kg, o superior, en función de la posibilidad de exposición humana (siempre que ésta se conozca) no ha provocado efecto tóxico alguno, cabe considerar inútil la continuación de la experiencia.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Los animales se alojarán en jaulas individuales. El régimen ideal comprende la administración, a los animales, de la sustancia ensayada los 7 días de la semana durante un período de 90 días.

Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben observarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. El período de exposición diario será de 6 horas.

La sustancia estudiada se aplicará uniformemente sobre una zona que corresponda aproximadamente al 10 % de la superficie corporal total. En caso de sustancias muy tóxicas, la zona tratada puede ser inferior, pero se cubrirá con una capa lo más uniforme y delgada posible.

Durante la exposición, la sustancia estudiada se mantiene en contacto con la piel con ayuda de un apósito de gasa poroso y esparadrapo no irritante. Además, la zona tratada se cubrirá de forma que se mantengan colocados el apósito y la sustancia y se impida a los animales la ingestión de ésta. Cabe utilizar dispositivos de sujeción para evitar la ingestión de la sustancia objeto de estudio, pero no se recomienda la inmovilización completa.

Al final del período de exposición, se eliminará la sustancia restante, siempre que sea posible, por medio de agua o algún otro método apropiado de limpieza de la piel.

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales. Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes de los grupos de tratamiento no satélites. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

- b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y gluamicooxaloacética ⁽²⁾ séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.
- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales accesorios, vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), (esternón con médula ósea), (fémur, incluida superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

- a) Se someterán a un examen histopatológico completo la piel normal y la tratada, y los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y los de dosis máxima.
- b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.
- c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.
- d) Si se utilizan ratas, se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico en busca de signos de infección, ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.
- e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2.

RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba
- dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se expone a diario, durante un período de tiempo determinado, a varios grupos de animales de experimentación, a concentraciones diferentes de la sustancia objeto de estudio, una concentración por grupo, durante un plazo de 90 días. En los casos en que se emplea un vehículo como ayuda para lograr una concentración apropiada de la sustancia ensayada en la atmósfera, se utilizará un grupo de control del vehículo. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran durante la prueba se someterán a autopsia, que se practicará también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. En caso necesario, se añadirá a la sustancia estudiada un vehículo adecuado que ayude a lograr una concentración apropiada de la sustancia en la atmósfera. Si se utilizaran un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, deberán saberse exentos de efectos tóxicos. Si se juzga oportuno, pueden emplearse datos publicados.

*Condiciones del ensayo**Animales de experimentación*

Salvo indicación en contrario, la especie preferible es la rata. Se utilizarán animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual. Al principio del estudio, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio apropiado. Cuando se realice un estudio de inhalación subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (diez hembras y diez machos) para cada concentración de exposición. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (diez de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Concentración de exposición

Son necesarias al menos tres concentraciones, y un control o control del vehículo (correspondiente a la concentración del vehículo en el nivel de exposición máximo). Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Período de exposición

La exposición diaria será de 6 horas tras la obtención de las concentraciones en la cámara de exposición. Cabe utilizar otros períodos para satisfacer necesidades especiales.

Equipo

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Cuando se utilice una cámara, deberá ser de características tales que permita un hacinamiento mínimo de los animales y su exposición óptima a la sustancia objeto de ensayo. Como norma general para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada. También cabe recurrir a sistemas con exposición oronasal, de la cabeza sola o de todo el cuerpo en cámara individual; los dos primeros reducen la penetración por otras vías.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Se expone a los animales diariamente a la sustancia estudiada, a razón de 5 ó 7 días a la semana, durante un período de 90 días. Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. La temperatura a la que se efectúa la prueba debe mantenerse, con variaciones de $\pm 3^\circ$ en 22° C. La humedad relativa ideal sería la comprendida entre el 30 y el 70 %, pero en determinados casos (p. ej., pruebas con aerosoles) quizá no sea factible. Durante la exposición, se suprimirán el alimento y la bebida.

Se utilizará un sistema de inhalación dinámico que disponga de un sistema apropiado de control analítico de la concentración. Se recomienda practicar un primer ensayo para determinar las concentraciones de exposición adecuadas. Se ajustará el flujo de aire de forma que se garanticen unas condiciones de exposición homogéneas en toda la cámara. El sistema permitirá obtener condiciones de exposición estables con la mayor rapidez posible.

Se determinarán o controlarán:

- a) El flujo de aire (continuamente).
- b) La concentración real de la sustancia estudiada, medida en la zona de respiración. Durante el período de exposición diaria, la concentración no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio. No obstante, cuando se trate de polvos y aerosoles, quizá no sea posible esta precisión, y podrá aceptarse una desviación mayor. Se mantendrán durante la totalidad del estudio lo más constante posible las concentraciones diarias. Al ajustar el sistema generador, se practicará un análisis granulométrico de las partículas, para determinar la estabilidad de las concentraciones de aerosol. Durante la exposición, se practicarán con la frecuencia necesaria análisis para determinar la estabilidad de la distribución granulométrica.
- c) Temperatura y humedad.
- d) Durante la exposición y después de ella, se practican y registran sistemáticamente observaciones; se llevarán fichas individuales de cada animal. Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones deben figurar las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos, las membranas mucosas, los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Se determinarán cada semana el consumo de alimento y el peso de los animales. Es necesaria una observación periódica de los animales para

evitar la pérdida de alguno de ellos por causas como canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los animales supervivientes. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

- a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.
- b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.
- c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepática y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y glutamicoxaloacética ⁽²⁾ séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.
- d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, los pulmones — que se extirparán intactos, se pesarán y se tratarán con un fijador adecuado para garantizar el mantenimiento de su estructura (se considera método eficaz la perfusión con el fijador) —, los tejidos nasofaríngeos, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, pulmones, corazón, aorta, glándulas salivales, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), esternón con médula ósea, (fémur, incluida superficie articular), y (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

- a) Se someterán a un examen histopatológico completo el aparato respiratorio y otros órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.
- c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.
- d) Se someterán también a examen histopatológico los pulmones de los animales pertenecientes a los grupos con dosis baja e intermedia, por constituir un medio conveniente de valoración del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.
- e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba:
 - Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.
 - Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:
 - a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la concentración
- dosis carente de efectos, si es posible
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- hallazgos oftalmológicos
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ESTUDIO DE TERATOGENICIDAD: ROEDORES Y NO ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis o concentraciones diferentes, al menos durante la parte de la gestación en que tiene lugar la organogénesis, a varios grupos de animales de experimentación grávidos, a razón de una dosis por grupo. Poco antes de la fecha de parto prevista, se sacrifica a la madre, se extrae el útero y se examina su contenido. Este método de prueba investiga la embriotoxicidad y la toxicidad fetal.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Hembras jóvenes adultas y sanas vírgenes, de edad y tamaño semejantes, se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante al menos 5 días antes de la prueba. Posteriormente son apareadas con machos de fertilidad comprobada, tras lo cual se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada se administra a diario a las hembras desde poco después de la implantación y durante el período de la organogénesis. Un día antes del término, se extraen por histerectomía los fetos y se examinan en busca de anomalías viscerales o esqueléticas, incluidos retraso del crecimiento, osificación tardía y hemorragias intestinales.

*Condiciones del ensayo**Animales de experimentación*

Las especies de uso habitual son la rata, el ratón, el hámster y el conejo. Las preferidas son la rata y el conejo. Se utilizarán cepas de laboratorio de uso habitual. La cepa no debe ser de fecundidad escasa, y se caracterizará por su respuesta a los agentes teratógenos. Se alojará a los animales en jaulas individuales.

Número y sexo

Son necesarias para cada dosis al menos 20 ratas, ratones o hámsteres grávidas o 12 conejas grávidas. El objetivo es conseguir un número de camadas y crías suficiente para permitir una evaluación del potencial teratógeno de la sustancia.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Cuando se administre la sustancia estudiada en un vehículo, se utilizará también un grupo de control de éste. Si se emplea vehículo, han de conocerse sus propiedades toxicológicas; no deberá ser teratógeno ni ejercer efectos sobre la reproducción. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo o grupos de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del

grupo de prueba. A menos que lo impidan la naturaleza física/química o las propiedades biológicas de la sustancia, lo ideal sería que la dosis más alta provocara cierta toxicidad materna manifiesta, en forma, por ejemplo, de una leve pérdida de peso, pero no más de un 10 % de muertes maternas. La dosis más baja no generará efectos observables atribuibles a la sustancia objeto de estudio. La o las dosis intermedias se situarán geoméricamente entre las mayores y las más bajas.

Prueba de límite

Cuando se trate de sustancias de escasa toxicidad, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce indicios de embriotoxicidad o teratogénesis, pueden considerarse innecesarios los estudios con otras dosis.

Período de exposición

Se considerará día 0 de la prueba aquél en que se observe la presencia de tapón vaginal, esperma o ambos (cuando sea posible). El período de administración abarcará la etapa principal de la organogénesis, que serían los días 6-15 en la rata y el ratón, 6-14 en el hámster y 6-18 en el conejo. Si se toma por día 0 el de la observación del apareamiento, o el de la inseminación artificial, habrá que añadir 1 día a los plazos indicados. Otra posibilidad es la de ampliar el período de administración hasta aproximadamente 1 día antes de la fecha de parto prevista.

Período de observación

Es preciso practicar una exploración física detenida al menos una vez al día. Se efectuarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas para reducir al mínimo la pérdida de animales del estudio.

Procedimiento

La sustancia objeto de estudio se administra oralmente por alimentación forzada. Deberá darse aproximadamente a la misma hora todos los días.

Los animales hembras reciben diariamente la sustancia ensayada durante el período de tratamiento apropiado. La dosis puede basarse en el peso de las hembras al principio de la administración de la sustancia; dado el rápido aumento de peso que experimentan durante la gestación, también cabe la posibilidad de pesar a los animales periódicamente para adaptar la dosis al último peso obtenido. Se registrarán, según se observen, los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Las hembras que muestren signos de aborto o parto prematuro se sacrificarán y someterán a un examen macroscópico completo. La observación postratamiento continuará hasta aproximadamente 1 día antes del término; el objetivo es cubrir la mayor parte del período de gestación, pero evitar complicar la interpretación de los resultados como consecuencia de partos naturales. Entre las observaciones realizadas deben figurar (aunque no de modo exclusivo) las de modificaciones de la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales.

Autopsia

En el momento de la muerte durante el estudio, o al final de él, se examinará macroscópicamente a la hembra en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas que puedan haber influido en la gestación. Inmediatamente después del fallecimiento, se extirpará el útero, cuyo contenido se examinará para investigar las muertes embrionarias o fetales y el número de fetos vivos. Suele ser posible calcular el momento de la muerte *in utero* cuando se ha producido. En ratas y conejos es posible determinar el número de cuerpos lúteos. Se determinarán el sexo y el peso de cada feto; con los datos recogidos, se calculará el peso fetal medio. Tras la extracción, se someterá a cada feto a examen externo. En ratas, ratones y hámsteres, se prepararán y examinarán en busca de anomalías esqueléticas del 30 al 50 % de los animales de cada camada, en tanto que el resto de los integrantes de las camadas se prepararán y examinarán mediante métodos apropiados en busca de anomalías de los tejidos blandos. En el caso de los conejos, se examinará cada feto mediante disección cuidadosa en busca de anomalías viscerales y, a continuación, se comprobará si existen anomalías esqueléticas.

2.

RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del estudio, el de los grávidos, el número y porcentajes de los fetos vivos y los fetos con anomalías esqueléticas y de los tejidos blandos y su relación con camadas específicas.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba
- dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
- datos de respuesta tóxica en función de la dosis
- dosis carente de efectos (si es posible)
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- duración de la gestación y datos de la camada (incluidos datos publicados)
- datos fetales (vivos/muertos, sexo, defectos esqueléticos y de tejidos blandos)
- datos de la camada (vivos/muertos, sexo, defectos esqueléticos y de tejidos blandos de cada camada)
- tratamiento estadístico de los resultados
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

*Condiciones del ensayo**Animales de experimentación*

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos, de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 40 animales (20 hembras y 20 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

En no roedores, puede aceptarse un número menor de animales, aunque no inferior a cuatro por sexo y grupo.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos definidos de toxicidad sin causar una mortalidad excesiva. La dosis más baja no debe provocar indicio alguno de toxicidad.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgentes de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las dos vías de administración principales son la oral y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

El uso de la vía dérmica plantea problemas prácticos considerables. Normalmente, es posible deducir la toxicidad crónica general debida a la absorción percutánea de los resultados de la prueba hecha por vía oral y de la cantidad de sustancia absorbida por vía percutánea en pruebas de toxicidad percutánea previas.

Estudios orales:

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una vía posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas. Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios de inhalación:

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) con una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de, al menos, 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a $22^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70 %, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable.

Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad, cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La duración del período de administración será de, al menos, doce meses.

Procedimiento

Observaciones

Se realizará, al menos una vez al día, una exploración clínica detenida. Se practicarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas apropiadas para reducir al mínimo las pérdidas de animales del estudio, en forma, por ejemplo, de autopsia o refrigeración de los animales encontrados muertos, y de aislamiento o sacrificio de los débiles o moribundos. Son necesarias observaciones detenidas para apreciar el comienzo y la evolución de efectos tóxicos, así como para reducir las pérdidas de animales por enfermedad, autólisis o canibalismo.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Se registrarán el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos, incluidos los presuntos tumores.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad. Se determinará la ingestión de alimento cada semana durante las 13 primeras del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo que el estado de salud o las modificaciones del peso aconsejen otra actitud.

Examen hematológico

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematíes y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y a los seis meses, y después con intervalos aproximados de seis y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo. Además, a los no roedores se les extraerá una muestra antes de la prueba.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada/sexo/grupo en el caso de los roedores:

— aspecto: volumen y densidad en cada animal

- proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)
- microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Química clínica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de química clínica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

- concentración de proteínas totales
- concentración de albúmina
- pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y transaminasa glutamicooxaloacética ⁽²⁾, gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindescarboxilasa
- metabolismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas
- pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro ⁽³⁾ (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluidas paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivales, hígado ⁽³⁾, bazo, riñones ⁽³⁾, suprarrenales ⁽³⁾, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas ⁽³⁾, órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y ojos. El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

Se examinarán al microscopio todas las alteraciones visibles, y en particular los tumores y demás lesiones aparecidas en cualquier órgano. Se recomiendan además los procedimientos siguientes:

- a) Examen microscópico de todos los órganos y tejidos conservados, con descripción completa de todas las lesiones encontradas en:
 1. los animales muertos o sacrificados durante el estudio, y
 2. los animales del grupo con dosis máxima y controles.
- b) Se examinarán también los órganos o tejidos de animales con dosis mínima que muestren anomalías causadas de forma indudable o posible por la sustancia objeto de estudio.
- c) Cuando el resultado de la prueba indique una reducción sustancial del período vital de los animales o la inducción de efectos capaces de influir en la respuesta tóxica, se someterá al examen citado en el párrafo anterior a los animales tratados con la dosis inmediatamente inferior.
- d) Es indispensable disponer de información sobre la incidencia de las lesiones que afectan normalmente a la cepa de animales en condiciones iguales a las de la prueba (es decir, datos de control publicados) para evaluar correctamente el significado de las modificaciones observadas en los animales tratados.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa.

⁽³⁾ Estos órganos, de diez animales por sexo y grupo en los roedores y de todos los no roedores, se pesarán, lo mismo que la tiroides (con las paratiroides) de todos los roedores.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

- a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones
 - datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
 - dosis carente de efectos
 - momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
 - descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
 - momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
 - datos sobre alimentación y peso
 - hallazgos oftalmológicos
 - pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
 - pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
 - hallazgos de autopsia
 - descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
 - tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
 - comentario de los resultados
 - interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE CARCINOGENESIS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad, y en particular la aparición de tumores.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos cinco días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores y no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínimos, como una leve disminución de la ganancia de peso corporal (inferior al 10%), sin alterar de manera notable la duración normal de la existencia a causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10% de la dosis alta.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará otro grupo de control que no se expondrá al vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una vía posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis semanales es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales cinco días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los siete días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio.

Una diferencia es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición:

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la

sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5% del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo de aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el periodo diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio. Durante todo el estudio, las concentraciones se mantendrán lo más constantes posible de un día a otro.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a $22^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de él no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

Una prueba de carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta 24 meses en ratones y hámsteres y hasta 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25%. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta, por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10% de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50%, en ratones y hámsteres a los 18 meses y a los 24 en ratas.

Procedimiento

Observaciones

Las observaciones diarias de los animales en sus jaulas deben incluir los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno de ellos por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se registrarán los signos clínicos y la mortalidad para todos los animales. Ha de prestarse una atención especial a la tumorigénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejaran otra cosa el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

*Exámenes clínicos***Hematología**

Si las observaciones indicaran un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se determinará la fórmula leucocitaria de los animales afectados.

A los 12 y 18 meses y antes del sacrificio, se obtiene de los animales un frotis sanguíneo. Se determinará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales de los grupos con dosis máxima y de control. Si estos datos, especialmente los obtenidos antes del sacrificio, o los obtenidos del examen histopatológico así lo aconsejan, se determinarán también las fórmulas leucocitarias en el grupo o grupos inmediatamente inferiores.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Se conservarán todos los tumores o lesiones macroscópicas visibles, así como las lesiones que se sospeche son tumores.

Se conservarán en medios adecuados para un posible examen histopatológico los órganos y tejidos siguientes: cerebro (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, pulmones y tráquea, corazón, aorta, glándulas salivares, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales secundarios, piel, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio infático representativo, glándula mamaria femenina, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea, fémur (incluida articulación) y ojos.

El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se estudiará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Examen histopatológico

- a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán al microscopio en todos los grupos todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones que se sospeche son tumores.
- c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano o tejido de que se trate en los demás grupos.
- d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.
- c) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos o de otro tipo capaces de influir en una respuesta neoplásica se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

- a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
 - b) temperatura y humedad del aire
 - c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
 - d) naturaleza del vehículo, si se emplea
 - e) concentraciones reales en la zona de respiración
 - f) dimensiones medias de las partículas (si procede)
- dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones
- datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
- datos sobre alimentación y peso
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, con descripción de los métodos empleados
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGENESIS**1. MÉTODO****1.1. Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El objetivo de una prueba combinada de toxicidad crónica y carcinogénesis es determinar los efectos crónicos y cancerígenos de una sustancia en una especie de mamífero tras exposición prolongada.

A este fin, se completa una prueba de carcinogénesis con un grupo satélite tratado y otro de control, por lo menos. La dosis empleada para el grupo satélite con dosis máxima puede ser superior a la utilizada para idéntico grupo en la prueba de carcinogénesis. Los animales de la prueba de carcinogénesis se examinan tanto en busca de signos de toxicidad general como de una respuesta cancerígena. Los animales del grupo satélite tratado se examinan en busca de signos de toxicidad general.

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al $\pm 20\%$ del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

El grupo o grupos satélites tratados para la evaluación de alteraciones patológicas distintas de los tumores contendrán 20 animales de cada sexo, en tanto que el grupo de control satélite constará de 10 animales de cada sexo.

Dosis y frecuencia de exposición

Para el estudio de la carcinogénesis se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínima, como una disminución en la ganancia de peso corporal (inferior al 10%), sin alterar en medida notable la duración normal de la existencia por causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10% de la dosis máxima.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Para estudiar la toxicidad crónica, se incluirán en la prueba grupos tratados adicionales y un grupo satélite de control correspondiente. La dosis máxima de los animales satélites tratados producirá signos definidos de toxicidad.

Normalmente, la frecuencia de exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, se preferirá la vía oral de administración. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como a modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

- (i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.
- (ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del $\pm 15\%$ del valor medio.
- (iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a $22^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.
- (iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La parte de la prueba dedicada a la carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres, y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o de índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta los 24 meses en ratones y hámsteres, y los 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25 %. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10 % de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50 % a los 18 meses en ratones y hámsteres, y a los 24 en ratas.

Los grupos satélites de 20 animales tratados por sexo y 10 animales de control asociados por sexo, utilizados para estudiar la toxicidad crónica, se mantendrán en la prueba durante al menos 12 meses. Se programará el sacrificio de estos animales para determinar la posible existencia de patología relacionada con la sustancia estudiada y no complicada por alteraciones gerontológicas.

Procedimiento

Observaciones

Los animales deben observarse diariamente en sus jaulas, comprobando los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Se efectuarán exploraciones clínicas a intervalos apropiados en los animales de los grupos satélites tratados.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Ha de prestarse una atención especial a la tumorigénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópico o palpable; se registrarán asimismo el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejaran otra actitud el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

Exámenes clínicos

Hematología

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematíes y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y los seis meses, después con intervalos aproximados de seis meses y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada sexo/grupo en el caso de los roedores:

- aspecto: volumen y densidad en cada animal
- proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)
- microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Bioquímica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de bioquímica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

- concentración de proteínas totales
- concentración de albúmina
- pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica ⁽¹⁾ y transaminasa glutamicooxaloacética ⁽²⁾, gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindescarboxilasa
- metabolismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas
- pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

⁽¹⁾ Conocida actualmente como alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro ⁽¹⁾ (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluida paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivares, hígado ⁽¹⁾, bazo, riñones ⁽¹⁾, suprarrenales ⁽¹⁾, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas ⁽¹⁾, órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y otros.

Aunque el inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el método óptimo de conservación de estos tejidos, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

En el apartado de toxicidad crónica:

Se practicará un examen detallado de los órganos conservados de todos los animales de los grupos satélites con dosis máxima y de control. Si se encontrara patología relacionada con la sustancia estudiada en el grupo satélite con dosis máxima, se someterán a un examen histopatológico completo y detallado los órganos efectores de los demás animales de cualquier otro grupo satélite tratado, así como los de los grupos tratados del apartado de carcinogénesis del estudio, a la conclusión de éste.

En el apartado de carcinogénesis:

- a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.
- b) Se examinarán al microscopio, en todos los grupos, todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones, que se sospeche son tumores, aparecidas en cualquier órgano.
- c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano, o tejido de que se trate, en los demás grupos.
- d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.
- e) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos, o de otro tipo, capaces de influir en una respuesta neoplásica, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

⁽¹⁾ Se pesarán estos órganos, de diez animales por sexo y grupo de roedores.

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

- a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación
- b) temperatura y humedad del aire
- c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)
- d) naturaleza del vehículo, si se emplea
- e) concentraciones reales en la zona de respiración
- f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

- dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones
- datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
- datos de la respuesta tóxica, por sexo y dosis
- descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
- momento de observación de cada signo anómalo y evaluación de éste
- hallazgos oftalmológicos
- datos sobre alimentación y peso
- pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
- pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
- tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P) recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos, para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en el estro. A continuación, se apareará a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el periodo de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los periodos de gestación y lactancia. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante el período experimental apropiado. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales sanos, no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él.

El objetivo es conseguir gestaciones y prole suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno de los animales de la generación P así como en la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F₁ desde la concepción al destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden suministrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química, o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo de alteración del rendimiento reproductor, serán necesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, serán necesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 a 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considerara conveniente la producción de una segunda camada; se les sacrificará y examinará en algún momento antes de finalizar el estudio. En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación, por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F₁. Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar a su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y de apareamiento, puede determinarse a diario el consumo de alimento. Tras el parto y durante la lactancia, se determinará el consumo de alimento (o de agua cuando la sustancia en estudio se administre en el agua de bebida) en los mismos días en que se pesen las camadas. Los machos y hembras P se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su prole.

Patología

Autopsia

Cuando los animales de la generación P se sacrifiquen, o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectoros de todos los animales P. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales con dosis máxima y en los controles y en los animales que mueran durante el estudio, siempre que sea posible.

Se examinarán entonces, en todos los demás animales P, los órganos que muestren anomalías en aquéllos. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado al exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de machos fértiles, el de hembras grávidas, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, los resultados numéricos se enumerarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie y cepa utilizada
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad

- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta el día previsto para el sacrificio al final del estudio
- tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento postnatal
- día de observación de cada signo anómalo y su evolución
- datos de peso de los animales P
- hallazgos de autopsia
- descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos de la generación paterna (P) deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P), recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos; para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso sobre el estro. A continuación, se aparean a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. Tras el destete, continúa la administración de la sustancia a la descendencia F₁ durante su crecimiento hasta la edad adulta, su apareamiento y producción de una generación F₂, hasta el destete de esta generación F₂. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuyen al azar los animales sanos para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales P se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante la totalidad del período experimental. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación: selección de la especie

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales P sanos no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él. El objetivo es conseguir gestaciones y prole suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, y

de la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F_1 desde la concepción a la madurez, así como del desarrollo de su descendencia (F_2) hasta el destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden administrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno, y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo alguno de alteración del rendimiento reproductor, son innecesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, son innecesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 ó 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considera conveniente la producción de una segunda camada; se sacrificarán y examinarán en algún momento antes de finalizar el estudio.

En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F_1 .

Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

El tratamiento de los animales F_1 se iniciará con el destete, y terminará cuando se sacrifiquen.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma. Habida cuenta de la espermatogénesis, la generación F_1 no se apareará hasta que tenga por lo menos 11 semanas si son ratones, o 13 si son ratas. Para el apareamiento de la generación F_1 , se seleccionan al azar un macho y una hembra de cada camada para apareamiento cruzado con una cría de otra camada del mismo grupo de tratamiento, con objeto de producir la generación F_2 . Los machos y hembras F_1 no seleccionados para apareamiento se sacrificarán al destete.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere emplear la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías. Las camadas F_2 se ajustan de la misma manera.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y apareamiento, puede determinarse semanalmente el consumo de alimento. Opcionalmente, cabe medirlo a diario. Tras el parto y durante la lactancia se determinará el consumo de alimento en los mismos días en que se pesen las camadas. Los animales progenitores (P y F_1) se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Todos los animales adultos P y F_1 se sacrificarán cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos en la reproducción. La descendencia F_1 , no seleccionada para apareamiento, y toda la generación F_2 se sacrificarán tras el destete.

Cuando todos los animales progenitores (P y F_1) se sacrifiquen o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epididimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectoros de todos los animales P y F_1 . En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales P y F_1 con dosis máxima y en los controles seleccionados para apareamiento y, siempre que sea posible, en los que mueran durante el estudio. Se examinarán entonces en todos los demás animales los órganos que muestren anomalías en aquellos animales. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado el exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. RESULTADOS*Tratamiento de los resultados*

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de animales grávidos, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, se evaluarán los resultados numéricos por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie y cepa utilizada
- datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad
- momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta su conclusión
- tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento posnatal
- día de observación de cada signo anómalo y su evolución
- datos de peso de los animales P y F₁ seleccionados para apareamiento
- hallazgos de la autopsia
- descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

TOXICOCINÉTICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra por una vía apropiada. Según el objetivo del estudio, puede administrarse en dosis única o repetida, durante períodos determinados, a uno o varios grupos de animales de experimentación. Con posterioridad, y en función del tipo de estudio, se determinan la sustancia, o sus metabolitos, o ambos en los líquidos, los tejidos o las excreciones corporales.

Pueden realizarse estudios con formas «marcadas» o «no marcadas» de la sustancia probada. Cuando se utilice el marcado, su posición en la sustancia debe suministrar la mayor información posible sobre el destino del compuesto.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se aclimatan animales jóvenes y sanos a las condiciones del laboratorio durante, al menos, cinco días previos a la prueba. Antes de ella, se distribuye al azar a los animales para formar grupos de tratamiento. En casos especiales pueden emplearse animales muy jóvenes, grávidos o tratados previamente.

*Condiciones del ensayo**Animales de experimentación*

Los estudios toxicocinéticos pueden efectuarse en una o varias especies animales apropiadas; se tendrán en cuenta las especies utilizadas o que esté previsto utilizar en otros estudios toxicológicos con la misma sustancia. Cuando se empleen roedores en una prueba, la variación ponderal no será superior al $\pm 20\%$ del peso medio.

Número y sexo

Para estudios de absorción y excreción, cada grupo contendrá inicialmente 4 animales. No es necesaria la elección de un sexo determinado, pero en ciertas circunstancias puede ser preciso estudiar ambos sexos. Si se apreciaran respuestas diferentes según el sexo, se estudiarán cuatro animales de cada uno. Cuando los estudios se hagan con no roedores, pueden utilizarse menos animales.

Si se estudia la distribución en los tejidos, al considerar el tamaño del grupo inicial se tendrán en cuenta el número de animales que se sacrificarán en cada fecha de examen establecida y el número de exámenes.

Cuando se estudie el metabolismo, el tamaño del grupo estará acorde con las necesidades del estudio.

En los estudios con varias dosis y exámenes intermedios, al considerar el tamaño del grupo se tendrá en cuenta el número de exámenes y de sacrificios previstos; no obstante, estará formado por al menos dos animales. El tamaño del grupo será suficiente para permitir una evaluación aceptable del aumento, la estabilización y la reducción (según convenga) de las concentraciones de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos.

Dosis

Cuando se administre una sola dosis, se utilizarán al menos dos niveles posológicos: una dosis baja con la que no se observen efectos tóxicos, y otra alta capaz de producir modificaciones de los parámetros toxicocinéticos o efectos tóxicos.

Si se administran dosis reiteradas, suele bastar la dosis baja, aunque en circunstancias determinadas quizá sea necesaria también una dosis alta.

Vía de administración

Los estudios toxicocinéticos se efectuarán por medio de la misma vía y, cuando convenga, del mismo vehículo empleado o que esté previsto emplear en los demás estudios de toxicidad. La sustancia analizada suele administrarse oralmente por alimentación forzada o en el alimento, aplicarse a la piel o administrarse por inhalación durante períodos definidos a grupos de animales de experimentación. La administración intravenosa de la sustancia puede ser útil para determinar la absorción relativa por otras vías. Además, es posible obtener información útil sobre el patrón de distribución poco después de la administración intravenosa de una sustancia.

Se tendrá presente la posibilidad de una interferencia del vehículo con la sustancia estudiada. Se prestará atención a las diferencias de absorción entre la administración de las sustancias analizadas por alimentación forzada y en el alimento y la necesidad de una determinación exacta de la dosis, sobre todo cuando se administre el compuesto en el alimento.

Período de observación

Se observará a diario a todos los animales, se registrarán los signos de toxicidad y otros rasgos clínicos relevantes, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración de los mismos.

Procedimiento

Después de pesar a los animales, se administra la sustancia objeto de estudio por una vía apropiada. Si se considera oportuno, puede mantenerse a los animales en ayunas antes de la administración de la sustancia.

Absorción

El índice y el grado de absorción de la sustancia administrada pueden valorarse por métodos diversos, con grupos de referencia ⁽¹⁾ o sin ellos, por ejemplo mediante:

- determinación de la cantidad de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos en las excretas, como orina, bilis, heces, aire espirado y el contenido en el caparazón
- comparación de la respuesta biológica (p. ej., estudios de toxicidad aguda) entre los grupos de experimentación y de control o referencia (o ambos)
- comparación de la cantidad de sustancia, metabolitos o ambos, excretada por vía renal en los grupos de prueba y de referencia
- determinación de la zona bajo la curva, concentración plasmática/tiempo de la sustancia analizada, sus metabolitos o ambos, y comparación con datos de un grupo de referencia

⁽¹⁾ En este método, se entiende por grupo de referencia aquél al que se administra la sustancia analizada por otra vía que garantiza una disponibilidad completa de la dosis.

Distribución

Existen actualmente dos métodos, de los que uno o ambos pueden utilizarse para analizar los patrones de distribución:

- se obtiene información cualitativa útil, mediante técnicas autorradiográficas del cuerpo entero
- se obtiene información cuantitativa, por sacrificio de los animales en momentos diferentes tras la exposición para determinar la concentración y la cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en tejidos y órganos.

Excreción

En los estudios de excreción, se recogen orina, heces y aire espirado, y en determinadas circunstancias bilis. La cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en estas excretas se determinarán, en varios momentos tras la exposición, hasta que se haya excretado alrededor del 95 % de la dosis administrada o durante siete días, si tal porcentaje no se alcanza antes.

En casos especiales, tal vez deba tenerse en cuenta la excreción de la sustancia en la leche de animales lactantes de experimentación.

Metabolismo

Para determinar el modo y la intensidad del metabolismo, se analizarán muestras biológicas por técnicas apropiadas. Se estudiarán las estructuras de los metabolitos y se propondrán vías metabólicas apropiadas cuando haya necesidad de responder a interrogantes planteados por estudios toxicológicos previos. Quizá sea útil realizar estudios *in vitro* para obtener información sobre las vías metabólicas.

Es posible obtener información complementaria sobre la relación del metabolismo con la toxicidad mediante estudios bioquímicos, como la determinación de los efectos sobre sistemas enzimáticos metabolizantes, la depleción de compuestos endógenos con grupos sulfhidrilos no proteicos y la unión de la sustancia a macromoléculas.

2. RESULTADOS

Según el tipo de estudio realizado, se resumirán los resultados en forma de tablas, complementadas por gráficos cuando proceda. Se mostrarán para cada grupo, cuando convenga, las variaciones medias y estadísticas de las determinaciones en relación con el tiempo, la posología, los tejidos y los órganos. Se establecerán, por métodos apropiados, el grado de absorción y la cantidad e índices de excreción. Cuando se realicen estudios de metabolismo, se indicará la estructura de los metabolitos identificados, y se presentarán las vías metabólicas posibles.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
- caracterización de los materiales marcados, cuando se utilicen
- niveles posológicos e intervalos utilizados
- vía o vías de administración y vehículos utilizados
- efectos tóxicos y de otro tipo observados
- métodos de determinación de la sustancia objeto de ensayo, sus metabolitos o ambos en muestras biológicas, incluido el aire espirado
- presentación en tablas de las determinaciones en función de sexo, dosis, régimen, tiempo, tejidos y órganos

- indicación del grado de absorción y excreción con el tiempo
- métodos de caracterización e identificación de los metabolitos en muestras biológicas
- métodos de las determinaciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo
- vías de metabolismo propuestas
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGENESIS — MUTACIÓN GÉNICA —
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

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

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

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

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

Activación metabólica

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

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

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

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

Medios

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

Uso de testigos negativos y positivos

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

Concentración de exposición

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

Condiciones de incubación

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

Frecuencia de mutación espontánea

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

Número de repeticiones

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

Procedimiento

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

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

2. RESULTADOS

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

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

RECOMBINACIÓN MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

En *Saccharomyces cerevisiae*, es posible apreciar la recombinación mitótica entre los genes (o, más generalmente, entre un gen y su centrómero) y en el interior de ellos. En el primer caso, se habla de *crossing-over*, generador de intercambios recíprocos, en tanto que, en el segundo los intercambios, casi nunca son recíprocos, y se habla de conversión génica. El *crossing-over* se determina generalmente por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota, mientras que la conversión génica lo es mediante la producción de inversores prototróficos en una cepa auxotrofa heteroalélica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen. Las cepas de uso más frecuente para descubrir una conversión génica mitótica son D₄ (heteroalélica para *ade 2* y *trp 5*), D₇ (heteroalélica para *trp 5*), BZ₃₄ (heteroalélica para *arg 4*) y JD1 (heteroalélica para *his 4* y *trp 5*). El *crossing-over* mitótico productor de sectores homocigotos de color rojo y rosa se determina en D₅ o en D₇ (que también sirve para analizar la conversión génica mitótica y la mutación inversa para *ilv 1-92*), cepas ambas heteroalélicas complementarias de los alelos *ade 2*.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

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

Activación metabólica

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

*Condiciones del ensayo**Cepas experimentales*

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

Medios

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

Uso de testigos negativos y positivos

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

Concentraciones de exposición

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

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

Condiciones de incubación

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

Frecuencia de recombinaciones mitóticas espontáneas

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

Número de repeticiones

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

Procedimiento

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

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

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

2.

RESULTADOS

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

Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Pueden utilizarse sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir mutaciones provocadas por sustancias químicas. Entre las líneas celulares de mayor uso figuran las células de linfoma de ratón L5178Y y las líneas celulares CHO y V-79 del hámster chino. En estas líneas celulares, los sistemas de uso más común determinan las mutaciones en los loci de la timidinquinasa (TK), la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) ⁽¹⁾ y la Na⁺/K⁺ ATPasa. Los sistemas mutacionales TK y HPRT revelan mutaciones de pares de bases, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura del código genético (*frameshift mutations*) y deleciones pequeñas por su parte, el sistema Na⁺/K⁺ sólo descubre las mutaciones de pares de bases.

Las células deficientes en timidinquinasa (TK) a causa de la mutación directa TK⁺/TK⁻ son resistentes a la bromodeoxiuridina (BrdU), a la fluorodesoxiuridina (FdU) o a la trifluorotimidina (TFT), ya que estos antimetabolitos no son incorporados a los nucleótidos celulares por la timidinquinasa del sistema enzimático de «salvamento»; los nucleótidos necesarios para el metabolismo celular sólo se obtienen mediante síntesis *de novo*. No obstante, en presencia de timidinquinasa, se incorporan a los nucleótidos BrdU, FdU o TFT, con las consiguientes inhibición del metabolismo celular y citotoxicidad. Así pues, las células mutantes proliferan en presencia de BrdU, FdU o TFT, al contrario que las normales, que contienen timidinquinasa. De igual modo, las células deficientes en HPRT son seleccionadas por resistencia a la 8-azaguanina (AG) o a la 6-tioguanina (TG). Las células con Na⁺/K⁺ ATPasa alterada se seleccionan por resistencia a la cuabaina.

La citotoxicidad se averigua determinando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad para formar colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La frecuencia de mutantes se establece mediante la siembra de un número conocido de células en un medio que contenga agente selectivo para descubrir las células mutantes, y en un medio que no lo contenga para determinar las células supervivientes. Tras un período de incubación apropiado, se cuentan las colonias. Las frecuencias de mutantes se calculan a partir del número de colonias mutantes, y en función del índice de supervivencia celular.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Células

Pueden utilizarse para este ensayo líneas celulares diversas, entre las que cabe citar los subclones de L5178Y, las células CHO o V-79, con sensibilidad demostrada a los mutágenos químicos, gran eficacia de clonado y frecuencia de mutación espontánea escasa. Pueden examinarse periódicamente las células empleadas para comprobar la estabilidad del cariotipo y la inexistencia de contaminación por *mycoplasma*. Es posible recurrir a otros tipos celulares, siempre que esté perfectamente comprobada su validez para poner de manifiesto mutaciones génicas inducidas por vía química.

⁽¹⁾ Antes HGPRT.

Medio

Se utilizarán medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (p. ej., temperatura, recipientes de cultivo, concentraciones de CO₂ y humedad). Medios y sueros se elegirán en función de los sistemas selectivos y el tipo celular empleados en el ensayo.

Sustancia estudiada

Las sustancias analizadas pueden prepararse en los medios de cultivo, o disolverse o suspenderse en vehículos apropiados antes de tratar las células. La concentración final del vehículo en el sistema de cultivo no debe influir en la viabilidad ni en el índice de crecimiento de las células.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a la sustancia analizada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero apropiado. Cuando se utilicen tipos celulares con actividad metabólica intrínseca, deberá tenerse la certeza de que el índice y la naturaleza de la actividad son adecuados para la clase química objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

Se iniciarán en cada experimento controles positivos, utilizando una sustancia de acción directa y otra que precise activación metabólica; se empleará asimismo un control negativo (vehículo).

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

- compuestos de acción directa:
 - etilmetanosulfonato
 - hicantona
- compuestos de acción indirecta:
 - 2-acetilaminofluoreno
 - 7,12-dimetilbenzantraceno
 - N-nitrosodimetilamina.

Si se considera oportuno, se incluirá un control positivo extra perteneciente a la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán varias concentraciones de la sustancia estudiada. Las empleadas deben provocar un efecto tóxico relacionado con la concentración; la concentración máxima originará una supervivencia escasa, y la mínima, una supervivencia semejante a la observada en el control negativo.

Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias tóxicas claramente hidrosolubles, la concentración máxima se determinará en cada caso.

Procedimiento

El número de células utilizadas por cultivo debe estar en relación con la frecuencia de mutaciones espontáneas; la regla general consiste en emplear un número de células viables igual a diez veces la inversa de la frecuencia de mutaciones espontáneas.

Las células se expondrán durante un período suficiente, que en la mayoría de los casos será de 2-5 horas. Las células que no tengan actividad metabólica intrínseca suficiente se expondrán a la sustancia objeto de estudio en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia estudiada, y se someten luego a cultivo para determinar la viabilidad y permitir la expresión del fenotipo mutante.

Al terminar el período de expresión, que será suficiente para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes inducidos, se cultivan las células en un medio, con agentes selectivos (y sin ellos), para determinar tanto el número de mutantes como la viabilidad.

Todos los resultados se confirman en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se expondrán en forma de tablas en las que aparezcan los recuentos por placa, para la sustancia estudiada y los controles, en lo que respecta a la inducción de mutación y a la supervivencia. Se indicarán también el número medio de colonias por placa y la desviación estándar. La frecuencia de mutación se expresará como número de mutantes por número de células supervivientes. El índice de supervivencia y las eficacias de donado se expresan en porcentaje del valor control.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- línea celular utilizada, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares
- condiciones de ensayo: composición de los medios, concentración de CO₂, concentración de la sustancia estudiada, vehículo usado, temperatura de incubación, período de incubación, longitud del período de expresión (incluido el número de células sembradas, los subcultivos y los programas de aporte nutritivo, si procede), duración del tratamiento, densidad celular durante él, tipo de sistema de activación metabólica de mamífero utilizado, controles positivo y negativo, agente selectivo utilizado
- justificación de la elección de las dosis
- método empleado para enumerar las células viables y mutantes
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

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

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

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

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

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

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

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

Uso de testigos negativos y positivos

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

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

Concentraciones de exposición

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

Células

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

Activación metabólica

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

Procedimiento

Preparación de los cultivos

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

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

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

Tratamiento de los cultivos con la sustancia estudiada

Hepatocitos primarios de rata

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

Líneas celulares establecidas y linfocitos

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

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

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

*Análisis***Determinaciones autorradiográficas**

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

Determinación por LSC

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

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

2.1. Determinaciones autorradiográficas

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

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

2.2. Determinaciones por LSC

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

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME**3.1. Datos el ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

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

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

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

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

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

Uso de controles positivos y negativos

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

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

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

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

Concentraciones de exposición

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

Procedimiento

Preparación de los cultivos

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

Tratamiento

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

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

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

Recolección de las células

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

Preparación y teñido de los cromosomas

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

Análisis

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

2. RESULTADOS

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

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

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

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Animales de experimentación

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

Sustancia objeto de estudio

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

Número de animales

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

Vía de administración

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

Uso de controles negativos y positivos

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

Niveles de exposición

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

Procedimiento

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

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

2. RESULTADOS

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

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

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Células

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

Medio

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

Sustancia objeto de estudio

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

Actividad metabólica

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

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

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

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

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

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

Concentraciones de exposición

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

Procedimiento

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

2. RESULTADOS

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

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

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

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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

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

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

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

*Condiciones del ensayo**Vía de administración*

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

Animales de experimentación

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

Número y sexo

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

Uso de controles negativos y positivos

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

Dosis

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

Prueba de límite

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

Procedimiento

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

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

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

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

2.

RESULTADOS

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

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

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

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

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

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO CITOGÉNÉTICO DE CÉLULAS EMBRIONARIAS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Esta prueba citogenética *in vivo* permite descubrir aberraciones cromosómicas estructurales en los espermatogonios. Consisten en el análisis de las mitosis de los espermatogonios en busca de aberraciones de tipo cromatidiano y cromosómico.

Se emplean en este método preparaciones de testículos de mamíferos expuestos a la sustancia química estudiada por vías apropiadas y sacrificados a intervalos variables. Antes del huso, como la colquicina, para acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico(c-metafase). Se obtienen preparaciones de cromosomas que se secan al aire, se tiñen y se analizan al microscopio.

El análisis de espermatozoides en diacinesis, metafase I, en busca de multivalentes de translocación después de tratamiento de las células tronco de los espermatogonios, puede aportar información complementaria útil.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles, se disuelven o suspenden en un vehículo apropiado. Se utilizarán soluciones recién preparadas del compuesto analizado. Si se recurre a un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar la sustancia estudiada ni producir efectos tóxicos.

Vía de administración

En general, las sustancias analizadas sólo se administrarán una vez. Basándose en la información toxicológica disponible, podrá emplearse un programa de tratamiento reiterado, únicamente cuando la sustancia no ejerza efecto citotóxico en los espermatogonios en diferenciación.

Las vías de administración usuales son la oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras.

Animales de experimentación

Se utilizan casi siempre ratones y hámsteres chinos, pero cabe recurrir a cualquier otra especie de mamífero.

Se utilizan machos sexualmente maduros que se distribuyen al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

Número de animales

Han de emplearse al menos cinco machos por grupo experimental y de control.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento grupos simultáneos de control positivo y negativo (vehículo).

Las sustancias de control positivo se utilizarán en una dosis baja apropiada (p. ej., mitomicina C, intraperitonealmente, a razón de 0,3 mg/kg) para demostrar la sensibilidad de la prueba.

Dosis

Se emplea una dosis de la sustancia estudiada de la intensidad máxima tolerada o que produzca signos de toxicidad. Si tal dosis provoca la destrucción de numerosas células, deberá utilizarse una dosis más baja que origine citotoxicidad. Cuando sea necesario establecer una relación dosis-respuesta, habrán de usarse al menos tres dosis (p.ej., para confirmar una respuesta positiva débil). Las sustancias atóxicas se estudiarán a la dosis máxima posible, ya sea la administración única o repetida.

Procedimiento

En general, sólo se administra una vez la sustancia estudiada a los animales. En el grupo que recibe la dosis máxima, se recogen muestras con tres intervalos tras el tratamiento. La muestra intermedia se obtiene a las 24 horas. Dado que la sustancia estudiada puede influir en la cinética del ciclo celular, las muestras primera y tercera se recogen, con intervalos apropiados, en un plazo de 6 a 48 horas tras la administración de la sustancia. Cuando se utilicen otros niveles posológicos, se obtendrán muestras durante la fase especialmente sensible o, cuando no se conozca, 24 horas después del tratamiento.

También cabe la posibilidad de emplear un programa de tratamiento reiterado. En tal caso, se sacrifica a los animales 24 horas después del último tratamiento. Pueden obtenerse otras muestras entre las 6 y las 24 horas posteriores al tratamiento.

Preparación de los testículos

Para el análisis de las mitosis de los espermatogonios, se inyecta a los animales por vía intraperitoneal una dosis apropiada de un inhibidor del huso, como la colchicina. Acto seguido, se sacrifica a los animales tras un período adecuado, que en los ratones es de 3 a 5 horas, en tanto que en los hámsteres chinos puede superar las 5 horas.

Se utiliza la técnica de secado al aire, aunque según la especie empleada pueden ser necesarias modificaciones del método estándar. Se obtienen suspensiones celulares, que se tratan con solución hipotónica y se fijan. Las células se extienden sobre portaobjetos y se tiñen. Se asigna un código a los portaobjetos antes de analizarlos al microscopio.

Análisis

Se analizan al menos 100 metafases mitóticas bien extendidas, con el número completo de centrómeros, en busca de aberraciones cromosómicas estructurales. Además, es posible determinar el índice de mitosis de los espermatogonios con relación a la primera y la segunda metafases meióticas en una muestra total de 100 células en división por animal para establecer un posible efecto citotóxico.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que se indiquen por separado todos los tipos de aberraciones para cada animal de control y tratado. Se incluirán el número total de células analizadas y el de células aberrantes por grupo. Se facilitarán las medias y la desviación estándar para todos los parámetros. Se recogerá en forma de tabla el índice medio de mitosis de los espermatogonios en relación con las metafases meióticas primera y segunda para cada grupo experimental y de control.

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME**3.1. Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- especie y cepa de los machos, edad y peso de los machos
- número de animales de cada grupo experimental y de control
- condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles posológicos, disolventes, inhibidor del huso utilizado
- número de células analizadas por animal en cada grupo
- para cada animal tratado y de control, tipo y número de aberraciones, por separado
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se trata de una prueba que se realiza *in vivo* en ratones, cuyos embriones en desarrollo se exponen a la sustancia estudiada. Las células efectoras de los embriones en desarrollo son los melanoblastos, y los genes efectores son los responsables de la pigmentación del pelo. Los embriones son heterocigotos para cierto número de estos genes. Una mutación en el alelo dominante de tal gen o su pérdida (a consecuencia de fenómenos genéticos diversos) en un melanoblasto provoca la expresión del fenotipo recesivo en sus células descendientes, con la aparición consiguiente de una mancha de otro color en el pelo del ratón resultante. Se cuenta el número de descendientes portadores de manchas (mutaciones), y se compara su frecuencia con la observada en la descendencia procedente del desarrollo de embriones tratados únicamente con el disolvente. La prueba de la mancha en el ratón descubre supuestas mutaciones somáticas en las células fetales.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias se disuelven o suspenden en solución salina isotónica. Las que sean insolubles en agua se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no debe alterar la sustancia estudiada ni provocar efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Animales de experimentación

Se aparean animales de la cepa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{ch}/c^{ch} ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con la cepa HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearlpe/pe) o con la C57 BL (nonagouti, a/a). Pueden utilizarse otros cruces apropiados, como entre NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) y DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), siempre que produzcan descendencia nonagouti.

Número y sexo

Se tratan hembras grávidas suficientes para obtener un número de descendientes vivos apropiado para cada nivel posológico utilizado. El tamaño de la muestra dependerá del número de manchas observadas en los ratones tratados y de la importancia del número de datos de control. Sólo se considerará aceptable un resultado negativo si se han examinado al menos 300 descendientes de hembras tratadas con la dosis máxima.

Uso de controles negativos y positivos

Ha de disponerse de datos de control simultáneos procedentes de ratones tratados sólo con el vehículo (controles negativos). Pueden agruparse datos de control históricos obtenidos en el mismo laboratorio para mejorar la

sensibilidad de la prueba, siempre que tales datos sean homogéneos. Si la sustancia analizada no resulta ser mutágena, deberá disponerse de datos de control positivos obtenidos en fecha reciente en el mismo laboratorio con una sustancia de potencial mutágeno conocido en esta prueba.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal de las hembras grávidas. Cuando convenga, se recurrirá al tratamiento por inhalación u otras vías de administración.

Dosis

Se utilizan al menos dos niveles posológicos, incluido uno que origine signos de toxicidad o reduzca el tamaño de las camadas. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima practicable.

Procedimiento

Normalmente, se administra un tratamiento único los días 8, 9 ó 10 de la gestación, considerando como día 1 aquél en que se observe por primera vez el tapón vaginal. Estos días corresponden a 7,25, 8,25 y 9,25 días tras la concepción. Pueden efectuarse, pasados estos días, tratamientos sucesivos.

Análisis

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento, se asignan códigos a la descendencia y se comprueba si existen manchas. Se distinguen tres clases de manchas:

- a) las manchas blancas a menos de 5 mm de la línea mesoventral, que se suponen consecuencia de muerte celular (WMVS),
- b) las manchas amarillas, de tipo agouti, asociadas con los pezones, los órganos sexuales, la garganta, las regiones axilar e inguinal y la parte central de la frente, que se suponen debidas a falta de diferenciación (MDS), y
- c) las manchas pigmentadas y blancas repartidas al azar por el pelaje, que se creen resultado de mutaciones somáticas (RS).

Se cuentan las tres clases, pero sólo la última, la RS, tiene significación genética. Los problemas que plantea la diferenciación de las clases MDS y RS pueden solucionarse examinando muestras de pelo con el microscopio de fluorescencia.

Se observarán las anomalías morfológicas macroscópicas evidentes de la descendencia.

2. RESULTADOS

Los datos se presentarán en forma del número total de crías examinadas y del número de las que presenten una o varias manchas supuestamente debidas a mutación somática. Se compararán por métodos apropiados los datos de los animales tratados y los controles negativos. Asimismo, se ofrecerán los resultados considerando la camada como unidad.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- cepas utilizadas en el cruce
- número de hembras grávidas en los grupos experimental y de control
- tamaño medio de las camadas en los grupos experimentales y de control en el nacimiento y al destete
- dosis de la sustancia estudiada
- disolvente utilizado

- día de la gestación en que se administró el tratamiento
- vía de administración
- número total de descendientes examinados, y número con WMVS, MDS y RS en los grupos experimental y de control
- anomalías morfológicas macroscópicas
- relación dosis/respuesta de RS, si es posible
- evaluación estadística
- comentario de los resultados
- interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La prueba de translocación hereditaria en el ratón descubre alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas en las células embrionarias de mamíferos, tal como se ponen de manifiesto en la descendencia de primera generación. Los tipos de alteraciones cromosómicas apreciados son translocaciones recíprocas y, si se incluye la descendencia femenina, pérdida del cromosoma X. Los portadores de translocaciones y las hembras XO muestran una fertilidad reducida que permite la selección de una descendencia F_1 para practicar un análisis citogenético. Una esterilidad total es consecuencia de tipos de translocación determinados (autosoma X y tipo c-t). Las translocaciones se observan citogenéticamente en las células meióticas en diacinesis-metafase I de los individuos machos, ya sean machos F_1 o hijos de hembras F_1 . Las hembras XO se identifican citogenéticamente por la presencia de sólo 39 cromosomas en las mitosis de la médula ósea.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles en agua, se disuelven o suspenden en vehículos apropiados. Se emplean soluciones recién preparadas de la sustancia estudiada. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar el compuesto analizado ni provocar efectos tóxicos.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras vías.

Animales de experimentación

Para facilitar la reproducción y la verificación citológica, estos experimentos se realizan con ratones; no es preciso que sean de una cepa determinada. Sin embargo, el tamaño medio de una camada de la cepa empleada deberá ser superior a 8, y relativamente constante. Se utilizarán animales sanos y sexualmente maduros.

Número de animales

El número de animales necesario depende de la frecuencia de translocaciones espontáneas, así como del índice mínimo de inducción preciso para obtener un resultado positivo.

La prueba suele realizarse mediante análisis de la descendencia masculina F_1 . Al menos 500 descendientes machos F_1 se analizan por grupo de dosis. Si se incluye la descendencia femenina F_1 son necesarios 300 machos y 300 hembras.

Uso de controles negativos y positivos

Debe disponerse de datos sobre controles adecuados procedentes de pruebas realizadas simultáneamente y de controles históricos. Si existen resultados aceptables de controles positivos procedentes de experimentos efectuados en fecha reciente en el mismo laboratorio, pueden utilizarse en lugar de un control positivo simultáneo.

Dosis

Se prueba una dosis, por lo general la máxima asociada con la producción de efectos tóxicos mínimos pero que no altere el comportamiento reproductor ni la supervivencia. Para establecer una relación dosis/respuesta, son necesarias otras dos dosis. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima posible.

Procedimiento

Tratamiento y apareamiento

Existen dos programas de tratamiento. De ellos, el más utilizado es la administración única de la sustancia estudiada. La sustancia también puede administrarse los 7 días de la semana durante 35 días. El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de administración, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de las células embrionarias tratadas. Al final del período de apareamiento, se coloca a las hembras en jaulas individuales. Cuando dan a luz, se registra la fecha, el tamaño de la camada y el sexo de los descendientes. Se desteta a toda la descendencia masculina y se descarta toda la femenina, salvo si se incluyen en el experimento.

Búsqueda de los heterocigotos de translocación

Se utiliza uno de los dos métodos posibles:

- estudio de la fertilidad de la descendencia F_1 , y verificación posterior de posibles portadores de translocaciones por análisis citogenéticos;
- análisis citogenético de toda la progenie F_1 masculina sin selección previa mediante estudio de fertilidad.

a) Estudio de la fertilidad

Es posible determinar la fertilidad reducida de un individuo F_1 observando el tamaño de la camada, analizando el contenido uterino de su compañera femenina o por ambos medios. Es necesario fijar los criterios de determinación de la fertilidad normal y reducida de la cepa de ratón utilizada.

Observación del tamaño de la camada: Los machos F_1 sometidos a estudio se colocan en jaulas individuales con hembras procedentes del mismo experimento o de la colonia. Las jaulas se inspeccionan a diario a partir de los 18 días tras el apareamiento. Se registran, en el momento del nacimiento, el tamaño de la camada y el sexo de la descendencia F_2 , y se descartan luego las crías. Si se estudia la descendencia femenina F_1 , se conserva la descendencia F_2 procedente de camadas pequeñas para un análisis en mayor profundidad. Las hembras portadoras de una translocación se someten a verificación por análisis citogenético de una translocación en cualquiera de sus descendientes machos. Las hembras XO se identifican por la modificación de sexos en su descendencia, que pasa de 1:1 a 1:2 machos/hembras. En un método secuencial, los machos F_1 normales no se someten a nueva verificación si la primera camada F_2 alcanza o supera un valor normal predeterminado; de lo contrario, se observan una segunda y una tercera camadas F_2 .

Los animales F_1 que no puedan clasificarse como normales tras observación de hasta un máximo de tres camadas F_2 se someten a un nuevo control mediante análisis del contenido uterino de sus compañeras femeninas, o sufren directamente análisis citogenético.

Análisis del contenido uterino: La reducción del tamaño de las camadas en los portadores de translocaciones se debe a la muerte de embriones, por lo que un número alto de implantes muertos indica la presencia de una translocación en el animal sometido a la prueba. Cada macho F_1 estudiado se aparea con 2 ó 3 hembras. Se comprueba si existe concepción mediante el examen matinal diario para descubrir la presencia de tapones vaginales. Las hembras se sacrifican 14 ó 16 días después, y se registra el número de implantes vivos y muertos presentes en su útero.

b) Análisis citogenético

Se obtienen preparaciones de testículos por el método de secado con aire. Los portadores de translocaciones se identifican por la presencia de configuraciones multivalentes en diacinesis metafase I en los espermatozoides primarios. La observación de al menos 2 células con una asociación multivalente constituye la prueba necesaria de que el animal estudiado es portador de una translocación.

Si no se ha realizado selección mediante análisis de la fecundidad, se practica estudio citogenético en todos los machos F_1 . Deben analizarse al microscopio un mínimo de 25 células en diacinesis/metafase I por macho. En los machos F_1 con testículos pequeños y que presenten una detención meiótica antes de la diacinesis, o en las hembras F_1 que se sospeche sean XO, es necesario el examen de las metafases mitóticas en los espermatogonios o en la médula ósea. La presencia de un cromosoma desusadamente largo o corto en 10 células, demuestra la existencia de una translocación especial que origina la esterilidad del macho (tipo c-t). Algunas translocaciones X autosomas que provocan la esterilidad del macho sólo pueden identificarse mediante un análisis de las bandas de cromosomas mitóticos. La presencia de 39 cromosomas en la totalidad de 10 mitosis es demostrativa de un estado XO en una hembra.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

Se registran, en el nacimiento y el destete para cada período de apareamiento, el tamaño medio de las camadas y la relación entre sexos.

En lo que respecta a la evaluación de la fertilidad de los animales F_1 , se expondrán el tamaño medio de las camadas procedentes de todos los apareamientos normales, así como el tamaño de cada una de las surgidas de animales F_1 portadores de translocación. En cuanto al análisis del contenido uterino, se harán constar el número medio de implantantes vivos y muertos producto de apareamientos normales, y el de implantantes vivos y muertos de cada apareamiento de portadores de translocación.

Respecto al análisis citogenético de la diacinesis-metafase I, se enumerarán el número de tipos diferentes de configuraciones multivalentes y el número total de células en cada portador de translocación.

Se comunicarán el número total de apareamientos y la duración del período de apareamiento de los individuos estériles F_1 . Se facilitarán asimismo el peso de los testículos y detalles del análisis citogenético.

Para hembras XO, se dan resultados del tamaño medio de la camada, de la razón de sexos de la progenie F_2 y del análisis citogenético.

Cuando se preseleccionan, por pruebas de fertilidad, posibles F_1 portadores de translocación, las tablas deben incluir información relativa a cuántos de éstos eran heterocigotos de translocación confirmados.

Se dan también datos de los experimentos de control negativo y control positivo.

3. INFORME

3.1. Datos de la prueba

El informe incluirá los datos siguientes:

- cepa de ratones, edad de los animales, pesos de los animales tratados
- número de animales reproductores de cada sexo en los grupos experimentales y de control
- condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles de las dosis, disolventes, frecuencia de apareamientos
- número y sexo de los descendientes por cada hembra, número y sexo de los descendientes criados para análisis de translocación
- tiempos y criterios de análisis de translocación
- número y descripción detallada de los portadores de translocación, incluyendo datos de reproducción y de contenido uterino, cuando proceda
- procedimientos citogenéticos y detalles del análisis microscópico, preferiblemente con fotografías
- evaluación estadística
- discusión de resultados
- interpretación de resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE C

Los métodos de ensayo descritos a continuación se destinan a la determinación de algunas de las propiedades ecotoxicológicas mencionadas en el Anexo VIII de la Directiva 79/831/CEE. Los notificantes deberán tener en cuenta que en el texto no se han incluido métodos para la determinación de las siguientes propiedades establecidas en el nivel 1 del Anexo VIII:

- estudio de toxicidad prolongada con *Daphnia magna*
- prueba sobre una planta superior
- estudio de toxicidad prolongada con un pez
- pruebas de acumulación en una especie.

Cuando se aprueben definitivamente métodos de ensayo adecuados para la determinación de estas propiedades, se publicarán en forma de otra adaptación al progreso técnico. Mientras tanto, los notificantes deberán utilizar métodos reconocidos internacionalmente que serán señalados por las autoridades competentes.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia en el crecimiento de una especie de alga verde unicelular. Ensayos relativamente cortos pueden determinar efectos en varias generaciones. Este ensayo puede adaptarse y aplicarse a varias especies de algas unicelulares, en cuyo caso deberá adjuntarse al informe del ensayo una descripción del método utilizado.

Este ensayo se aplica más fácilmente a sustancias hidrosolubles, las cuales, en las condiciones del ensayo, es muy probable que permanezcan en el agua.

Con relación a sustancias de solubilidad limitada en el medio del ensayo, no será posible determinar cuantitativamente la EC_{50} (véanse definiciones abajo).

Este ensayo se puede utilizar para sustancias que no interfieran directamente con la medición del crecimiento de las algas.

La siguiente información será útil cuando se realicen los ensayos:

- hidrosolubilidad
- presión de vapor
- fórmula estructural
- pureza de la sustancia
- estabilidad química en el agua y a la luz
- métodos de análisis para cuantificación de la sustancia en el agua
- valor pKa
- coeficiente de reparto, n-octanol/agua
- resultados de un ensayo de biodegradabilidad.

1.2. Definiciones y unidades

Concentración celular es el número de células por mililitro.

Crecimiento es el incremento en la concentración celular durante el período de ensayo.

Índice de crecimiento es el incremento en la concentración celular por unidad de tiempo.

EC_{50} en este ensayo es la concentración de la sustancia en estudio que conduce a una reducción de un 50 %, bien en el crecimiento bien en el índice de crecimiento relativo al control.

CSEO (concentración sin efecto observable), en este ensayo es la más alta concentración probada en la que el (los) parámetro(s) medido(s) no muestra(n) una inhibición significativa del crecimiento con relación a los valores del control.

1.3. Sustancias de referencia

Las sustancias de referencia podrán utilizarse como medio para identificar condiciones no satisfactorias de los ensayos. Si se usa una sustancia de referencia, los resultados deberán notificarse en el informe del ensayo. El dicromato de potasio podrá utilizarse como sustancia de referencia.

1.4. Principio del método de ensayo

Cultivos en crecimiento exponencial de algas verdes seleccionadas se expondrán a varias concentraciones de la sustancia en estudio, durante varias generaciones y en condiciones determinadas. La inhibición del crecimiento con relación al cultivo de control se determinará durante un período establecido.

1.5. Criterios de calidad

1.5.1. Condiciones para la validez del ensayo

La concentración celular en los cultivos de control deberá haberse incrementado en un factor de al menos 16, en un lapso de tres días.

La desaparición de la sustancia de ensayo del agua a la biomasa no invalida forzosamente el ensayo.

1.6. Descripción del procedimiento de ensayo

1.6.1. Preparaciones

1.6.1.1. Equipo y materiales

- Equipo habitual de laboratorio;
- matraces de un volumen apropiado (ejemplo: los matraces cónicos de 250 ml son apropiados cuando el volumen de la solución de prueba es de 100 ml);
- equipo de cultivo: local o cámara cuya temperatura oscile de 21° a 25° que pueda mantenerse a $\pm 2^\circ$ C, provisto de iluminación uniforme y constante de una variación espectral entre 400 y 700 nm (se recomienda un flujo cuántico de $0,72 \times 10^{20}$ fotones/m²s con una tolerancia del $\pm 20\%$. Este flujo cuántico es igual a 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ y puede obtenerse con lámparas universales de tipo fluorescente blanco (temperatura de la luz de aproximadamente 4 200K) que dan aproximadamente 8 000 lux medidos con un colector esférico);
- equipo para determinar concentraciones celulares, por ejemplo contador electrónico de partículas, microscopio con cámara de recuento, fluorímetro, espectrofotómetro, colorímetro. (Nota: con el fin de lograr medidas útiles a bajas concentraciones celulares cuando se utilice un espectrofotómetro, podrá ser necesario utilizar cubetas con una anchura de 4 cm al menos).

1.6.1.2. Medio de algas

Se recomienda el siguiente medio:

NH ₄ Cl:	15	mg/l,
MgCl ₂ .6H ₂ O:	12	mg/l,
CaCl ₂ .2H ₂ O:	18	mg/l,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	15	mg/l,
KH ₂ PO ₄ :	1,6	mg/l,
FeCl ₃ .6H ₂ O:	0,08	mg/l,
Na ₂ EDTA.2H ₂ O:	0,1	mg/l,
H ₃ BO ₃	0,185	mg/l,
MnCl ₂ .4H ₂ O:	0,415	mg/l,
ZnCl ₂ :	3×10^{-3}	mg/l,
CoCl ₂ .6H ₂ O:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
CuCl ₂ .2H ₂ O:	10^{-5}	mg/l,
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	7×10^{-3}	mg/l,
NaHCO ₃ :	50	mg/l.

El pH de este medio, previo equilibrio con el aire, es de 8 aproximadamente.

El medio de cultivo recomendado no excluye el uso de otros medios, siempre que se respeten los límites o constituyentes esenciales:

P:	$\leq 0,7$ mg/l,
N:	≤ 10 mg/l,
quelantes:	$\leq 10^{-3}$ mmol/l,
dureza (Ca + Mg):	$\leq 0,6$ mmol/l.

El medio recomendado y el citado en la referencia 1, cumplen este requisito.

1.6.1.3. Organismos experimentales

Selección de especies

Es aconsejable que las especies de algas verdes seleccionadas sean de rápido crecimiento, aptas para cultivos y ensayos. Las siguientes especies se consideran propicias:

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b

Si se utilizasen otras especies, deberá notificarse cuáles.

1.6.1.4. Proyecto del ensayo

Concentración celular inicial

Es recomendable que la concentración celular inicial en los cultivos del ensayo sea de 10^4 células/ml aproximadamente para *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus subspicatus*. Cuando se utilicen otras especies la biomasa deberá ser comparable.

Concentración de la sustancia en estudio

El margen de concentración en el que probablemente se pueden observar efectos, se determinará teniendo en cuenta los resultados de pruebas de determinación del mismo.

Para el ensayo, se seleccionarán por lo menos cinco concentraciones dispuestas en progresión geométrica. La concentración más baja probada no producirá efectos visibles en el crecimiento de las algas. La mayor concentración estudiada debería inhibir el crecimiento en, al menos, un 50% con relación al control y, preferiblemente, detener el crecimiento por completo.

Repeticiones y controles

La prueba se realizará, preferentemente, con tres réplicas de cada concentración e, idealmente, con el doble de controles. La prueba podrá alterarse, si se justifica, para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración.

Cuando se utilice un vehículo para disolver la sustancia de ensayo deberán incluirse más controles que incluyan dicho vehículo a las más altas concentraciones utilizadas.

1.6.2. Realización del ensayo

Este apartado contiene orientaciones para el estudio de sustancias muy solubles, poco solubles y volátiles.

1.6.2.1. Ensayo con sustancias muy hidrosolubles

Los cultivos del ensayo que contienen la deseada concentración de sustancia en estudio y la adecuada cantidad de inóculo algal se preparan diluyendo en un medio de cultivo filtrado, partes alícuotas de solución madre de la sustancia de estudio y de suspensión algal.

Los matraces de cultivo se agitan y se colocan en el aparato de cultivo. Es necesario, durante el ensayo, mantener las algas en suspensión y facilitar el paso de CO_2 ; para ello, los matraces se podrán agitar, remover o airear. Los cultivos deberán mantenerse a una temperatura que oscile entre los 21 y 25° C, controlada a $\pm 2^\circ$ C.

La concentración celular en cada matraz se determinará por lo menos a las 24, 48 y 72 horas después del comienzo del ensayo. Se utiliza el medio de cultivo de algas filtrado para determinar el fondo, cuando se usen contadores de partículas o como blanco cuando se usen espectrofotómetros.

El pH se medirá al comienzo del ensayo y a las 72 horas.

El pH de las soluciones no deberá variar más de una unidad durante la pruebas.

1.6.2.2. Ensayo de sustancias de hidrosolubilidad limitada

Cuando la solubilidad de la sustancia en estudio esté dentro de la más alta concentración utilizada en el ensayo, sólo se necesitará una pequeña variación del procedimiento antes citado para establecer las soluciones de ensayo. Una solución saturada puede servir como solución madre de la sustancia de ensayo. Otro procedimiento puede ser disolver la sustancia de ensayo, a una concentración deseada, en el medio de cultivo antes de la introducción de la suspensión de algas.

La solución madre de sustancias de escasa hidrosolubilidad podrá prepararse por dispersión mecánica o mediante vehículos de baja toxicidad para las algas, tales como solventes orgánicos, emulsificantes o dispersores. Cuando se utilice un vehículo, la concentración no deberá exceder de 100 mg/l, y los controles adicionales, en los que se incluirá el vehículo a la máxima concentración presente en las soluciones de ensayo, deberán incluirse en el proyecto del ensayo.

1.6.2.3. Ensayo de sustancias volátiles

Hasta la fecha, no existe una forma generalmente aceptada para probar sustancias volátiles. Cuando una sustancia es conocida por su tendencia a vaporizarse, se podrán utilizar matraces cerrados de cuello ancho. Se han propuesto variantes de este método (véase referencia 1).

Se deberán llevar a cabo experimentos para determinar la cantidad de sustancia en estudio que permanece en las soluciones, y se aconseja una precaución extrema en la interpretación de los resultados de ensayos con productos químicos volátiles, cuando se utilizan sistemas cerrados.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

Las concentraciones celulares calculadas en los cultivos del ensayo y en los controles, se tabularán junto a las concentraciones de la sustancia en estudio y a los tiempos de medida. El valor medio de la concentración celular para cada concentración de la sustancia de prueba y en los controles, se representará en función del tiempo, para trazar curvas de crecimiento.

Para determinar la relación concentración / efecto se usarán los dos procedimientos siguientes.

2.1. Comparación de áreas bajo las curvas de crecimiento

El área bajo las curvas de crecimiento podrá calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

donde:

A = área,

N_0 = número nominal de células/ml a un tiempo t_0

N_1 = número medido de células/ml a un tiempo t_1

N_n = número medido de células/ml a un tiempo t_n

t_1 = tiempo de la primera medición después del comienzo del ensayo

t_n = tiempo de la n -ésima medición después del comienzo del ensayo.

El porcentaje de inhibición del crecimiento celular en cada concentración de la sustancia de ensayo (I_A) se obtiene mediante la diferencia entre el área bajo la curva del crecimiento del control (A_C) y el área bajo la curva de crecimiento en cada concentración (A_T), de la sustancia del ensayo como:

$$I_A = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100$$

Se representarán los valores I_A en papel semilogarítmico o en papel probit semilogarítmico en función de las correspondientes concentraciones. Si los puntos se han trazado en papel probit se unirán, a ojo, mediante una línea recta o cuando se espere una distribución logarítmica normal de los valores, podrá trazarse una línea de regresión calculada.

Un valor EC_{50} resulta de la intersección de la línea (de regresión) con la paralela dibujada en la abscisa, a $I_A = 50\%$. Para indicar este valor, de forma inequívoca, con relación a este método de cálculo se propone usar el símbolo E_bC_{50} . Con relación a este ensayo, que especifica las mediciones a las 24, 48 y 72 horas, el símbolo será E_bC_{50} (0-72 h).

Otros valores EC, como E_bC_{50} , podrán derivarse también del trazado I_A en función de la concentración logarítmica.

2.2. Comparación de índices de crecimiento

El índice medio específico de crecimiento (μ) para cultivos de crecimiento exponenciales podrá calcularse de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Alternativamente, el índice medio específico de crecimiento puede derivarse de la inclinación de la línea de regresión en una curva de $\ln N$ en función del tiempo.

El porcentaje de reducción en el índice medio de crecimiento en cada concentración de la sustancia de ensayo comparado con el valor del control, se trazará en función del logaritmo de la concentración. Su EC_{50} podrá leerse en el gráfico resultante. Para indicar de forma inequívoca el EC_{50} derivado de este método, se propone utilizar el símbolo E_rC_{50} . El tiempo de medición deberá indicarse. Por ejemplo, si el valor se relaciona con el tiempo indicado de 24 y 48 horas, el símbolo será: E_rC_{50} (24-48 h).

Nota: El índice de crecimiento, es un término logarítmico, y pequeños cambios en el índice de crecimiento pueden implicar grandes cambios en la biomasa. Por lo tanto, los valores E_bC y E_rC no son numéricamente comparables.

3. INFORME

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- Sustancia de ensayo: datos de identificación química.
- Organismos de ensayo: origen, cultivo de laboratorio, número de cepa, método de cultivo.
- Condiciones del ensayo:
 - fecha del comienzo y del fin del ensayo y su duración
 - temperatura

- composición del medio
 - equipo de cultivo
 - pH de las soluciones al comienzo y al final del ensayo (si se observa una diferencia del pH superior a una unidad, deberá adjuntarse explicación)
 - vehículos y métodos utilizados para disolver la sustancia de ensayo, y concentración del vehículo en las soluciones de ensayo
 - calidad e intensidad de la luz
 - concentraciones estudiadas (medidas o nominales).
- Resultados:
- concentración celular para cada matraz en cada punto de medición y método para medir la concentración celular
 - valores medios de concentración celular
 - curvas de crecimiento
 - representación gráfica de la relación concentración/efecto
 - valores EC y método de cálculo
 - CSEO
 - otros efectos observados.

4.

REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 201*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus»*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Anexo***EJEMPLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE ALGAS****Observaciones generales**

El objetivo del cultivo mediante el siguiente procedimiento es el de obtener cultivos de algas para pruebas de toxicidad.

Deberán utilizarse métodos apropiados que garanticen que los cultivos de algas no están infectados con bacterias (ISO 4833). Deberán utilizarse cultivos axénicos, pero serán esenciales los cultivos de una sola especie de alga.

Todas las operaciones deberán llevarse a cabo en condiciones estériles, con el fin de evitar la contaminación con bacterias y otras algas.

Equipo y material

Véase el punto 1.6.1: preparaciones y organismos experimentales.

Procedimientos para la obtención de cultivos de algas*Preparación de soluciones nutritivas (medios)*

Todas las soluciones nutritivas del medio se prepararán como las soluciones madre concentradas, debiendo conservarlas en sitio oscuro y frío. Dichas soluciones se esterilizarán por filtrado o autoclave.

El medio se preparará añadiendo la cantidad correcta de solución madre al agua esterilizada destilada, teniendo cuidado que no se produzcan contaminaciones. Para un medio sólido, se añadirá un 0,8 % de agar.

Cultivos de reserva

Los cultivos de reserva son pequeños cultivos de algas que se transfieren a un medio de cultivo fresco para que actúen como elemento inicial del ensayo. Si los cultivos no se usan regularmente, se mantienen en tubos de agar inclinados y se transfieren a un medio reciente por lo menos una vez cada dos meses.

Los cultivos de reserva se cultivan en matraces cónicos que contengan el medio apropiado (un volumen alrededor de 100 ml). Cuando las algas se incuben a 20° C con iluminación continua, será necesario hacer una transferencia semanal.

Durante la transferencia se llevará, con pipetas estériles, una cantidad de cultivo «antiguo» a matraces de medio fresco, de manera que con las especies de crecimiento rápido, la concentración inicial sea 100 veces menor que en el cultivo antiguo.

El índice de crecimiento de una especie puede determinarse a partir de la curva de crecimiento. Si éste se conoce, será posible calcular la densidad a la cual deberá transferirse el cultivo al nuevo medio. Esto deberá hacerse antes de que el cultivo alcance su fase letal.

Precultivo

El precultivo está concebido para obtener una cantidad apropiada de algas para la inoculación de cultivos de ensayo. Dicho precultivo deberá incubarse en las condiciones del ensayo y se utilizará cuando este aún en crecimiento exponencial, normalmente, después de un período de incubación de 3 días. Si los cultivos de algas contienen células deformadas o anormales, éstas deberán eliminarse.

TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA

ENSAYO CON SUELO ARTIFICIAL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

En este ensayo de laboratorio, la sustancia con la que se va a experimentar se añade a un suelo artificial en el que se colocan gusanos durante 14 días. Después de este período (que, opcionalmente, puede ser de siete días) se examina el efecto letal de la sustancia sobre los gusanos. Este ensayo provee un método que permite investigar, a relativamente corto plazo, los efectos causados por sustancias químicas sobre los gusanos, por absorción oral o cutánea.

1.2. Definición y unidades

CL₅₀: Concentración de una sustancia que se considera la causante de la muerte del 50% de los animales investigados durante el período de ensayo.

1.3. Sustancia de referencia

Se utiliza periódicamente una sustancia de referencia como medio para demostrar que la sensibilidad del sistema de ensayo no ha cambiado de manera significativa.

Se recomienda que esta sustancia sea la cloroacetamida de grado analítico.

1.4. Principio del ensayo

Por ser el suelo un medio variable, para este ensayo se utiliza marga artificial definida cuidadosamente. Los gusanos adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota del Anexo) se mantienen en una tierra artificial que se trata con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. El contenido de los recipientes se extiende sobre una bandeja a los 14 días (opcionalmente, pueden ser siete) del comienzo del ensayo y se cuentan los gusanos supervivientes para cada concentración.

1.5. Criterios de calidad

El ensayo se proyecta de forma que sea lo más reproducible posible con respecto al sustrato y al organismo de ensayo. La mortalidad en los controles no debe exceder del 10% al final del ensayo, o de lo contrario éste no es válido.

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. Materiales

1.6.1.1. Sustrato de ensayo

Como sustrato básico de ensayo usa un suelo artificial definido.

a) Sustrato básico (los porcentajes se expresan en términos de peso en seco:

- 10% de turba esfágnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos visibles de plantas y finamente molida).
- 20% de arcilla de caolinita, preferiblemente con más de un 50% de caolinita
- Alrededor del 69% de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50% de sus partículas sean de un tamaño de 0,05 a 0,2 mm). Si la sustancia no es lo suficientemente dispersable en agua, se deberán mantener disponibles 10 g por cada recipiente de ensayo para mezclarlos con la sustancia de ensayo más adelante.
- Alrededor de un 1% de carbonato cálcico (CO₃Ca), pulverizado y químicamente puro, que se añade con el fin de que el valor del pH sea de 6,0 ± 0,5.

b) Sustrato de ensayo:

El sustrato de ensayo contiene el sustrato básico, la sustancia de ensayo y agua desionizada.

El contenido de agua oscila entre el 25 y el 42% del peso en seco del sustrato básico. El contenido de agua de un sustrato se determina secando una muestra a una temperatura de 105° C, hasta alcanzar un peso constante. El criterio clave consiste en humedecer la tierra artificial hasta un punto en que no quede agua estancada. Se debe tener cuidado al hacer la mezcla, de manera que se obtenga una distribución uniforme de la sustancia de ensayo y del sustrato. Deberá registrarse la manera en que se introduce la sustancia de ensayo en el sustrato.

c) Sustrato de control:

El sustrato de control contiene el sustrato básico y agua. Si se usa un agente aditivo, el sustrato de control adicional debe contener la misma cantidad de agente aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensayo

Se utilizan recipientes de cristal (cubiertos adecuadamente con membranas, tapaderas o película de plástico con agujeros de ventilación) aproximadamente de un litro de capacidad y llenos de una cantidad de sustrato de ensayo húmedo o de control que sea equivalente a un peso en seco de 500 g de sustrato.

1.6.2. Condiciones del ensayo

Los recipientes se deberán mantener en cámaras climatizadas, a una temperatura de $20 (\pm 2)^\circ \text{C}$, con luz continua. La intensidad de la luz será de 400 a 800 lux.

El período de ensayo dura 14 días, aunque, opcionalmente, se puede evaluar la mortalidad a los siete días del comienzo del ensayo.

1.6.3. Procedimiento de ensayo**Concentraciones del ensayo**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso de sustancia por peso en seco de sustrato básico (mg/kg).

Ensayo para determinar la gama de concentraciones

Por medio de este ensayo se determina la gama de concentraciones que ocasiona porcentajes de mortalidad de cero a 100; con esta información se establece la gama de concentraciones que se vaya a utilizar en el ensayo definitivo.

La sustancia se estudiará a las siguientes concentraciones: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de sustancia / kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

Cuando vaya a realizarse un ensayo definitivo, bastará con un lote de ensayo para cada concentración y otro para el sustrato de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos, para llevar a cabo el ensayo de determinación de la gama de concentraciones.

Ensayo definitivo

Los resultados del ensayo para determinar la gama de concentraciones se usan para elegir cinco concentraciones como mínimo, en serie geométrica, que abarquen la gama de mortalidad del cero al 100 % y que difieran entre sí en un factor constante que no exceda de 1,8.

En los ensayos en que se utilice esta serie de concentraciones se estimará el valor de CL_{50} y de sus límites de confianza de la manera más precisa posible.

En el ensayo definitivo se utilizan, como mínimo, cuatro lotes de ensayo por concentración y cuatro sustratos de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos. Los resultados de estos lotes reproducidos son la media y la desviación típica.

Cuando de dos concentraciones consecutivas, en una proporción de 1,8, sólo se obtienen los porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50} .

Mezcla del sustrato de ensayo básico y de la sustancia de ensayo

Siempre que sea posible, el sustrato de ensayo no deberá estar compuesto de ningún otro agente adicional que no sea agua. Inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se mezcla una emulsión o dispersión de la sustancia de ensayo en agua desionizada disolvente con el sustrato de ensayo básico, o se rocía dicha emulsión sobre éste de manera uniforme con un rociador cromatográfico fino o con un aparato similar.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo).

Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia de ensayo sólo pueden utilizarse los agentes que se volatilizan rápidamente. El sustrato de ensayo debe ser ventilado antes de usarlo. Se repondrá la cantidad de agua evaporada. El sustrato de control deberá contener la misma cantidad de agente aditivo. Si la sustancia de ensayo no fuese soluble, dispersable o emulsionable en disolventes orgánicos, se mezclarán 10 g de una mezcla de arena de cuarzo finamente molido y la cantidad necesaria de sustancia de ensayo para tratar 500 g (peso en seco) de suelo artificial, con 490 g (peso en seco) de sustrato de ensayo.

Por cada lote de ensayo, se coloca en cada recipiente de cristal una cantidad de sustrato de ensayo húmedo equivalente a 500 g de peso en seco, y en la superficie del mismo se colocan diez gusanos, que han sido acondicionados durante 24 horas en un sustrato básico húmedo similar y a los que, después de lavarlos rápidamente, se les ha extraído el exceso de agua con papel de filtro antes de usarlos.

Los recipientes se cubren con tapas de plástico perforado, platos o película para evitar el secado del sustrato, y se guardan bajo las condiciones de ensayo durante 14 días.

Se evaluarán los resultados después de 14 días (u opcionalmente, después de siete días) del comienzo del ensayo. El sustrato se extiende en una placa de vidrio o de acero inoxidable. Se examinan los gusanos y se determina el número de supervivientes. Los gusanos se consideran muertos si no responden a un suave estímulo mecánico en la parte frontal de su cuerpo.

Cuando el examen se efectúa a los siete días, el recipiente se vuelve a llenar con el sustrato y los gusanos supervivientes se colocan otra vez en la superficie del mismo.

1.6.4. *Organismos de ensayo*

Los organismos de ensayo deberán ser adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota en el Anexo) (como mínimo con dos meses de edad y con clitelo) y de un peso húmedo de 300 a 600 mg (véase el Anexo para el método de reproducción).

2. DATOS

2.1. Tratamiento y evaluación de los resultados

Las concentraciones de la sustancia ensayada se registran con referencia a los porcentajes correspondientes de gusanos de tierra muertos.

Cuando los datos son adecuados, el valor de CL_{50} y los límites de fiabilidad ($p = 0,05$) se determinan por medio de métodos estándar (como el de Litchfield y Wilcoxon, 1949, o un método equivalente). El valor de CL_{50} debe ser expresado en mg de sustancia de ensayo por kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

En los casos en que la pendiente de la curva de concentración es tan pronunciada que no puede calcularse el valor de CL_{50} , se considera suficiente una estimación gráfica de este valor.

Cuando de dos concentraciones consecutivas en una proporción de 1,8 sólo se obtienen porcentajes de mortalidad de 0% y 100%, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50} .

3. INFORMES

3.1. Informe del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con los criterios de calidad mencionados anteriormente
- tipo de ensayo efectuado (ensayo de determinación de la gama de concentraciones y/o ensayo definitivo)
- descripción exacta de las condiciones del ensayo o declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con el método; se informará de cualesquiera diferencias con respecto a dicho método
- descripción exacta de la manera en que se ha mezclado la sustancia de ensayo con el sustrato de ensayo básico
- información acerca de los organismos de ensayo (especie, edad, peso medio y gama de variación, condiciones relativas a reproducción y cría, abastecedor)
- método usado en la determinación del valor de CL_{50}
- resultados del ensayo, incluidos todos los datos utilizados
- descripción de los síntomas o de los cambios en el comportamiento de los organismos de ensayo que se hayan observado
- mortalidad en los sustratos de control
- valor de CL_{50} o la máxima concentración con mortalidad y la mínima con una mortalidad del 100%, después de 14 días (y opcionalmente después de siete días) del comienzo del ensayo
- trazado de la curva de concentración — respuesta
- resultados obtenidos con la sustancia de referencia, ya sea en relación con el ensayo actual o con ejercicios previos de control de calidad.

4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 207*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Edwards, D. A. and Lofty, J. R., 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 96, 99-113.
- (5) CEE 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Anexo***Reproducción y cría de los gusanos con anterioridad al ensayo**

A fines de reproducción, se colocan en una caja de cría con sustrato fresco de 30 a 50 gusanos adultos, y se sacan después de 14 días. Estos animales se pueden utilizar para lotes de reproducción adicionales. Los gusanos nacidos de los capullos se utilizan en los ensayos una vez que han alcanzado la madurez (según las condiciones prescritas, después de dos a tres meses).

Condiciones de reproducción y cría

Cámara climatizada: a una temperatura de $20 (\pm 2)^\circ \text{C}$, preferiblemente con luz continua (intensidad de 400 a 800 lux).

Cajas de reproducción: recipientes poco profundos apropiados, con un volumen de 10 a 20 litros.

Sustrato: *Eisenia foetida*: Se puede criar en los excrementos de varios animales. Como medio de crianza se recomienda utilizar una mezcla con un 50% en volumen de turba y el otro 50% de excrementos de vaca o caballo. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato cálcico) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mmhos o una concentración de sal del 0,5%).

El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado.

Además del método expuesto anteriormente, se pueden utilizar otros procedimientos con éxito.

Nota: Existen dos razas de *Eisenia foetida*, que algunos taxonomistas han subdividido en especies (Bouche, 1972). Estas dos razas son morfológicamente similares, aunque una de ellas, la *Eisenia foetida foetida*, exhibe rayas o bandas transversales típicas en los segmentos, mientras que a la otra, la *Eisenia foetida andrei*, de color rojizo jaspeado, le faltan. Siempre que sea posible se utilizará la *Eisenia foetida andrei*. Se pueden utilizar otras especies, siempre que se disponga de la metodología necesaria.

BIODEGRADACIÓN

PRUEBA ZAHN — WELLENS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objeto de este método es la evaluación de la máxima degradación potencial de sustancias orgánicas solubles en agua y no volátiles, cuando se encuentran expuestas a concentraciones relativamente elevadas de microorganismos en un ensayo estático.

Puede producirse una absorción físico-química sobre los sólidos en suspensión y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados (véase 3.2).

Las sustancias que vayan a estudiarse serán utilizadas en concentraciones equivalentes a valores de COD entre los 50 y 400 mg/litro o valores de DQO entre los 100 y 1 000 mg/litro (COD = carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno). Estas concentraciones relativamente elevadas tienen la ventaja de ser analíticamente fiables. Los compuestos con propiedades tóxicas pueden retardar o inhibir el proceso de degradación.

En este método, la medida de la concentración de carbón orgánico disuelto, o la demanda de oxígeno químico, se utiliza para calcular la biodegradación máxima de la sustancia objeto del ensayo.

La utilización simultánea de un método analítico específico puede permitir calcular la biodegradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre)

Este método es aplicable solamente a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

- sean solubles en agua en las condiciones del ensayo
- tengan una presión de vapor insignificante en las condiciones del ensayo
- no provoquen inhibición en las bacterias
- sean absorbidas dentro del sistema del ensayo sólo hasta un cierto punto limitado
- no se pierdan a causa de la formación de espuma a partir de la solución del ensayo.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material del ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

1.2. Definiciones y unidades

La cantidad de degradación alcanzada al final del ensayo se presenta como la biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens:

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_V)}{(C_D - C_{VD})} \right] \times 100$$

D_T = biodegradación (%) en el tiempo T

C_D = valores de COD (o DQO) en la mezcla del ensayo medidos tres horas después del comienzo del mismo (mg/l). (COD = Carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno)

C_T = valores de COD o DQO en la mezcla del ensayo en el momento en que se toma la muestra (mg/l)

C_V = valores de COD o DQO del blanco en el momento de la toma de la muestra (mg/l)

C_{VD} = valores de COD y DQO en el blanco, medidos 3 horas después del comienzo de la prueba (mg/l).

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana.

El porcentaje de degradación se expresa como el porcentaje de supresión de COD (o DQO) de la sustancia objeto del ensayo.

La diferencia entre los valores medidos tras 3 horas y el valor inicial calculado, o preferiblemente medido, puede proporcionar una información útil sobre la eliminación de la sustancia (véase 3.2 «Interpretación de los resultados»).

1.3. Sustancias de referencia

En algunos casos, cuando se están investigando sustancias nuevas, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no se pueden recomendar sustancias de referencia específicas.

1.4. Principio del método de ensayo

Se ponen juntos, en un recipiente de vidrio de 1 a 4 litros de capacidad y equipado con un mezclador y un aireador, lodo activado, nutrientes minerales y el material del ensayo como única fuente de carbón en solución acuosa. Se remueve y se airea la mezcla a 20-25° C, bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro por un período de hasta 28 días. El proceso de degradación se controla por medio de la determinación de los valores de COD (o DQO) en la solución filtrada a intervalos diarios o a intervalos regulares que resulten apropiados. La relación entre la cantidad de COD (DQO) eliminada tras cada intervalo y el valor 3 horas después del comienzo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradación y sirve de medida del alcance de la degradación en ese momento.

El resultado se indica en un gráfico en función del tiempo para obtener así la curva de biodegradación.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

1.5. Criterios de calidad

Ha quedado demostrado que la reproducibilidad de esta prueba es satisfactoria en una prueba en varios centros.

La sensibilidad de este método viene determinada en gran medida por la variabilidad del blanco y, en menor medida, por la precisión de la determinación del carbón orgánico disuelto y el nivel del compuesto del ensayo en la mezcla líquida.

1.6. Descripción del procedimiento del ensayo

1.6.1. Preparativos

1.6.1.1. Reactivos

- Agua de ensayo: agua potable con un contenido de carbón orgánico menor de 5 mg/l. La concentración de iones de calcio y magnesio juntos no puede exceder los 2,7 mmoles/l; de otra manera, es necesaria una dilución suficiente con agua desionizada o destilada.
- Ácido sulfúrico, reactivo analítico (R.A.): 50 g/l
- Solución de hidróxido de sodio R.A.: 40 g/l
- Solución de nutriente mineral: disuélvase en un litro de agua desionizada:

cloruro de amonio, NH ₄ Cl, R.A.:	38,5 g
dihidrógeno fosfato de sodio, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O, R.A.:	33,4 g
dihidrógeno fosfato de potasio, KH ₂ PO ₄ , R.A.:	8,5 g
monohidrógeno fosfato de dipotasio, K ₂ HPO ₄ , R.A.:	21,75 g.

La mezcla sirve a la vez de elemento nutritivo y de sistema tampón.

1.6.1.2. Aparatos

- recipientes de vidrio de un volumen de 1 a 4 litros (p. ej., recipientes cilíndricos)
- mezclador con un agitador de vidrio o metal colocado en un eje apropiado. (El agitador debe girar a 5-10 cm por encima del fondo del recipiente). Se puede utilizar en su lugar un agitador magnético con una varilla de 7-10 cm de larga
- un tubo de vidrio de 2 a 4 mm de diámetro interior para introducir aire. La abertura del tubo debe estar a, más o menos, 1 cm por encima del fondo del recipiente
- una centrífuga (unos 3 550 g)
- un medidor de pH
- un medidor de oxígeno disuelto
- filtros de papel
- un aparato de filtración por membrana
- filtros de membrana, tamaño de los poros 0,45 µm. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración
- un equipo analítico para determinar el contenido de carbón orgánico y la demanda química de oxígeno.

1.6.1.3. Preparación del inóculo

Se lava (repetidamente) el lodo activado recogido en una planta de tratamiento biológico, centrifugándolo o dejándolo sedimentarse con agua de iguales características a la que se usa para el ensayo (antes citado).

El lodo activado tiene que estar en condiciones adecuadas. Este fango puede encontrarse en una planta depuradora de aguas residuales que funcione debidamente. Para coger tantas especies o cepas de bacterias diferentes como sea posible, puede ser preferible mezclar inóculos de diferentes fuentes (p. ej. diferentes plantas depuradoras, extractos de suelos, aguas de río, etc.). La mezcla debe ser tratada como se describe anteriormente.

Para comprobar la actividad del lodo activado, véase «Control funcional».

1.6.1.4. Preparación de las soluciones del ensayo

Pónganse, en el recipiente que se utiliza para el ensayo, 500 ml de agua de ensayo, 2,5 ml/l de una solución de nutrientes minerales y lodo activado en una cantidad equivalente a 0,2 a 1,0 g/l de materia seca en la mezcla final. Añádase suficiente solución madre de la sustancia a ensayar como para que en la mezcla final se obtenga una concentración de COD de 50 a 400 mg/l. Los valores correspondientes de DQO son 100-1 000 mg/l. Añádase agua de ensayo hasta llegar a un volumen total de 1 a 4 litros. El volumen total que se elija dependerá del número de muestras que se vayan a tomar para las determinaciones del COD y DQO y las cantidades necesarias para el procedimiento analítico. Normalmente, puede considerarse satisfactorio un volumen de 2 litros.

Se dispone por lo menos un recipiente de control (blanco), paralelamente a cada una de las series de ensayo, que contenga tan sólo una solución de lodo activado y la solución de nutrientes minerales, que se completará con agua de ensayo hasta alcanzar un volumen total igual al de los recipientes de ensayo.

1.6.2. Realización del ensayo

Se agitan los recipientes del ensayo con agitadores magnéticos o hélices bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro a 20-25° C. La aireación se efectúa con aire comprimido limpiado por medio de un filtro de algodón y lana y un frasco lavador si fuera necesario. Hay que asegurarse de que el lodo no sedimenta y de que la concentración de oxígeno no cae por debajo de los 2 mg/l.

Hay que controlar el pH a intervalos regulares (por ejemplo cada día) y, si fuera necesario, corregirlo ajustándolo a 7-8.

Las pérdidas por evaporación se compensan, justo antes de tomar cada muestra, con agua desionizada o destilada en las cantidades necesarias. Un buen procedimiento es marcar el nivel del líquido sobre el recipiente antes de iniciar el ensayo. Se hacen marcas nuevas después de cada toma (sin aireación y sin remover). Las primeras muestras se toman siempre 3 horas después del comienzo del ensayo, para detectar la absorción del material de ensayo por parte del lodo activado.

La eliminación del material de ensayo se controla por medio de las determinaciones de COD y DQO hechas diariamente o a intervalos regulares. Las muestras del recipiente utilizado para el ensayo y del recipiente de control son filtradas con un filtro de papel cuidadosamente lavado. Se desechan los primeros 5 ml de la solución filtrada. Los lodos difíciles de filtrar pueden ser separados previamente centrifugándolos durante 10 minutos. Las determinaciones de COD y DQO deben hacerse por lo menos por duplicado. El ensayo se lleva a cabo durante un período de hasta 28 días.

Nota: Las muestras que todavía estén turbias son filtradas con filtros de membrana. Los filtros de membrana no han de desprender ni absorber material orgánico alguno.

Control funcional del lodo activado

En un recipiente que contenga una sustancia conocida deben llevarse a cabo paralelamente cada serie de pruebas, con vistas a controlar la capacidad funcional del lodo activado. Se ha comprobado que el dietilenglicol es de utilidad para este propósito.

Adaptación

Si los análisis se llevan a cabo a intervalos relativamente cortos (p. ej., diariamente), se puede reconocer claramente la adaptación por medio de la curva de degradación (véase la Figura 2). Así pues, el ensayo no debe iniciarse justo antes del fin de semana.

Si la adaptación tiene lugar al final del período, el ensayo puede prolongarse hasta que finalice la degradación.

Nota: Si fuera necesario un conocimiento más amplio del comportamiento del lodo adaptado, se expone de nuevo el mismo lodo activado al mismo material del ensayo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Desconéctense el agitador y el aireador y permítase que el lodo activado se sedimente. Vacíese el líquido sobrenadante, añádase agua de ensayo hasta alcanzar los 2 litros, agítase durante 15 minutos y déjese sedimentar de nuevo. Después de haber vaciado de nuevo el líquido sobrenadante, utilícese el lodo que queda para repetir el ensayo con el mismo material, de acuerdo con los puntos 1.6.1.4 y 1.6.2. Se puede aislar el lodo activado centrifugando en vez de dejándolo sedimentar.

El lodo adaptado puede mezclarse con lodo fresco hasta alcanzar un total de 0,2 a 1 g de peso en seco, por litro.

Medios analíticos

Normalmente, se filtran las muestras con un filtro de papel cuidadosamente lavado (para lavarlo, utilícese agua desionizada).

Las muestras que sigan estando turbias se filtrarán con filtros de membrana (0,45 µm).

La concentración de COD se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado (se desechan los primeros 5 ml) por medio del instrumento TOC. Si el líquido filtrado no puede ser analizado el mismo día, tiene que almacenarse en el refrigerador hasta el día siguiente. No se recomienda un almacenaje más prolongado.

La concentración de DQO se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado con un sistema analítico siguiendo el procedimiento descrito en la referencia bibliográfica 2 posterior.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

Las concentraciones de COD y DQO se determinan en las muestras, por lo menos por duplicado, de acuerdo con el punto 1.6.2. La degradación en el tiempo T se calcula según la fórmula (con definiciones) dada en el punto 1.2.

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana. La cantidad de degradación lograda al final del ensayo se presenta como la «biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens».

Nota: Si se logra una degradación completa antes de que termine el período de duración del ensayo y si este resultado es confirmado por un segundo análisis al día siguiente, el ensayo puede darse por concluido.

3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- la concentración inicial de la sustancia
- cualquier otra información y los resultados experimentales relativos a la sustancia objeto del ensayo, a la sustancia de referencia, si se utiliza alguna, y al control
- la concentración después de tres horas
- la curva de biodegradación con una descripción
- fecha y lugar en que se tomaron las muestras de los organismos utilizados en el ensayo, status de adaptación, concentración utilizada, etc.
- causas científicas de cualquier cambio en el procedimiento del ensayo.

3.2. Interpretación de los resultados

La eliminación de COD (o DQO) que tiene lugar gradualmente, durante días o semanas, indica que la sustancia objeto del ensayo se está biodegradando.

No obstante, la absorción físico-química puede, en algunos casos, desempeñar un papel, y esto se pone de manifiesto cuando hay una eliminación completa o parcial desde el principio, dentro de las tres primeras horas, y la diferencia entre las mezclas líquidas sobrenadantes del control y del ensayo se mantienen a un nivel inesperadamente bajo.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una diferencia entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero lo más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de base fija (una prueba respirométrica preferentemente).

Las sustancias que en este ensayo den una eliminación de COD (o DQO) alta, y no debida a la absorción, deben ser consideradas como potencialmente biodegradables. Una eliminación parcial y no debida a la absorción indica que el producto químico puede sufrir al menos cierta biodegradación.

Una eliminación baja o nula de COD (o DQO) puede deberse a que la sustancia objeto del ensayo provoca la inhibición de los microorganismos. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida del lodo, produciendo sobrenadantes turbios. Se debe repetir el ensayo utilizando una concentración inferior de la sustancia objeto de estudio.

La utilización de un método analítico específico para el compuesto, o de una sustancia del ensayo marcada con ^{14}C , puede permitir una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de ensayo marcado con ^{14}C la obtención de $^{14}\text{CO}_2$ confirmará que se ha producido biodegradación.

Cuando los resultados se presenten en términos de biodegradación primaria, se debe dar, si fuera posible, una explicación sobre el cambio de estructura química que lleva a la pérdida de respuesta de la sustancia madre utilizada en el ensayo.

La validación del método analítico tiene que presentarse junto con la respuesta encontrada con el medio de ensayo control (blanco).

4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 B*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Anexo V C.9 Degradación: Demanda química de oxígeno, Directiva 84/449/CEE de la Comisión, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* N° L 251 de 19. 9. 1984.

Anexo

EJEMPLO DE EVALUACIÓN

Compuesto orgánico:	ácido 4-Etoxibenzoico
Concentración teórica de ensayo:	600 mg/l
COD teórico:	390 mg/l
Inóculo:	planta depuradora de aguas residuales . . .
Concentración:	1 g de material seco/litro
Status de adaptación:	no adaptado
Análisis:	determinación de COD
Cantidad de muestra:	3 ml
Sustancia de control:	dietilenglicol
Toxicidad del compuesto:	sin efectos tóxicos por debajo de los 1 000 mg/l. Ensayo utilizado: Ensayo de fermentación con tubos.

Tiempo de ensayo	Sustancia de control				Sustancia de ensayo		
	COD ⁽¹⁾ del control mg/l	COD ⁽¹⁾ mg/l	COD neto mg/l	Degradación (%)	COD ⁽¹⁾ mg/l	COD neto mg/l	Degradación (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 d	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 d	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 d	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 d	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 d	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 d	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 d	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 d	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Valores medios de determinaciones por triplicado.

Figura 1

Ejemplos de curvas de biodegradación

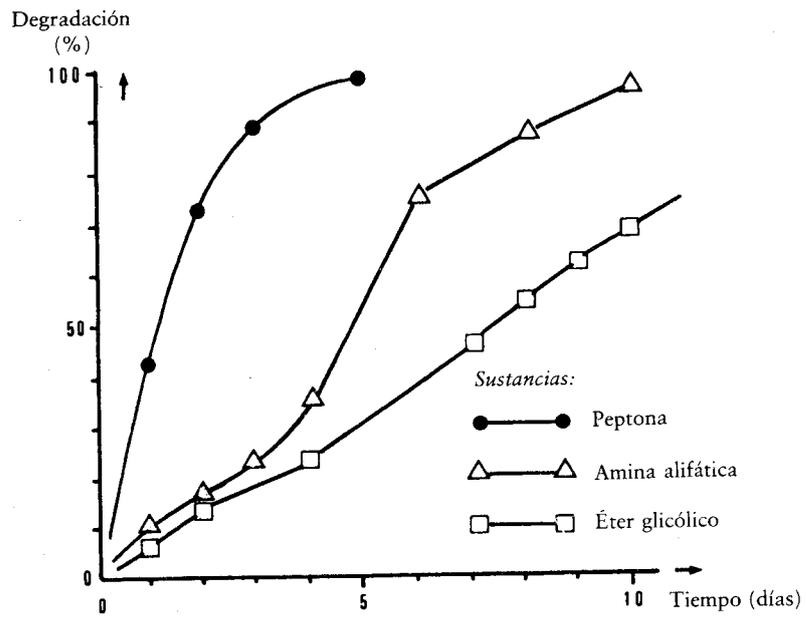
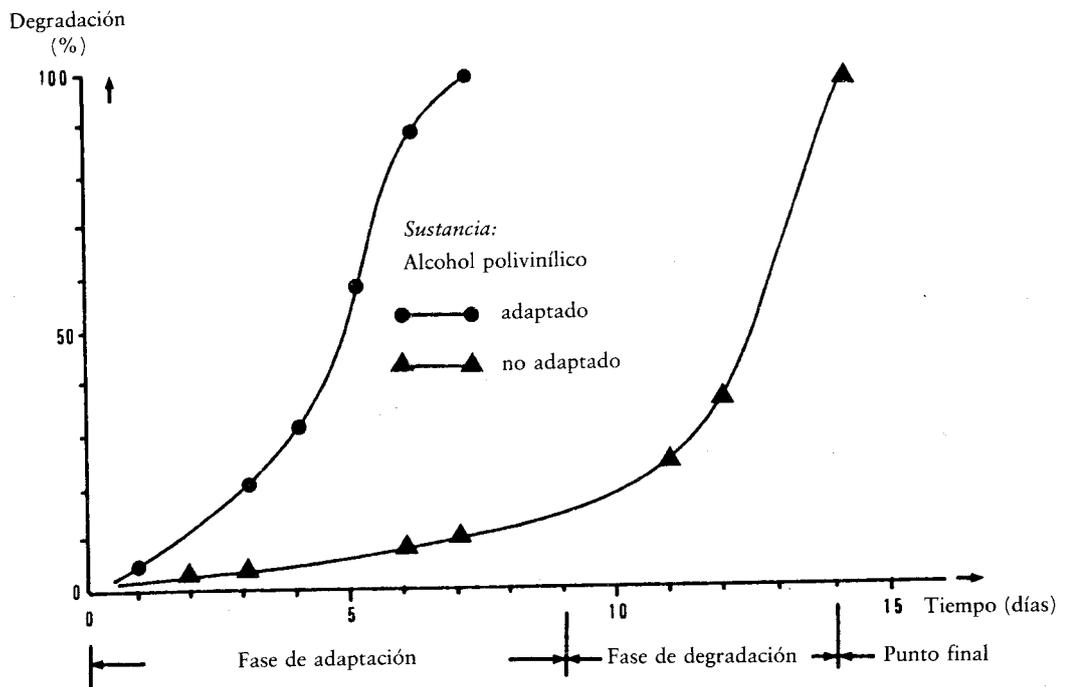


Figura 2

Ejemplos de adaptación del lodo



BIODEGRADACIÓN

ÉNSAYO DE SIMULACIÓN CON LODO ACTIVADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

1.1.1. *Comentarios generales*

Este método sólo es aplicable a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

- sean tan solubles en agua como sea necesario para la preparación de las soluciones de ensayo
- sometidas a las condiciones del ensayo, tengan una presión de vapor insignificante
- no provoquen inhibición en las bacterias.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material de ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

1.1.2. *Determinación de la biodegradabilidad máxima (análisis del COD/DQO)*

El objeto de este método es determinar la biodegradabilidad máxima a través de la medición de la eliminación de la sustancia y de cualquier metabolito en un modelo de planta de lodo activado con una concentración equivalente a > 12 mg de COD/l (o aproximadamente 40 mg de DQO/l). 20 mg de COD/l parece ser la óptima.

(COD = carbón orgánico disuelto por litro, DQO = demanda química de oxígeno). El contenido de carbón orgánico (o la demanda química de oxígeno) del material de ensayo tiene que ser determinado.

1.1.3. *Determinación de la biodegradabilidad primaria (análisis específico)*

El objeto del método es determinar la biodegradabilidad primaria de una sustancia en un modelo de planta de lodo activado, con una concentración de unos 20 mg/l, por medio de un método analítico específico (se puede utilizar una concentración superior o inferior si el método analítico y su toxicidad lo permiten). Esto permite la valoración de la biodegradabilidad primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El objeto de este método *no* es la determinación de la mineralización de la sustancia ensayada.

Se tiene que contar con un método analítico adecuado para la determinación de la sustancia.

1.2. Definiciones y unidades

1.2.1. *Análisis del COD/DQO*

El grado de eliminación de la sustancia viene dado por:

$$GE = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100 \% \quad [1 a)]$$

donde:

GE = grado de eliminación en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención medio dado con respecto al material de ensayo

T = concentración del material de ensayo en el afluente en mg de COD/litro (o mg de DQO/litro)

E = concentración de COD (o DQO) en el efluente de la unidad de ensayo en mg de COD/litro (o DQP/litro)

E_o = concentración de COD (o DQO) en el efluente del blanco en mg de COD/litro (o DQO/litro).

La degradación se expresa, como la eliminación, en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención dado con respecto al material de ensayo.

1.2.2. *Análisis específico*

La eliminación porcentual de la sustancia ensayada de su fase acuosa (R_a) dentro del tiempo medio de retención dado viene dada por:

$$R_a = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100 \% \quad [1 b)]$$

donde:

C_i = concentración de la sustancia en el afluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico)

C_o = concentración de la sustancia en el efluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico).

1.3. **Sustancias de referencia**

En algunos casos, cuando se está investigando una sustancia nueva, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no pueden recomendarse sustancias de referencia específicas.

1.4. **Principios de los métodos de ensayo**

Para determinar la biodegradabilidad máxima, se organizan paralelamente dos unidades piloto de lodo activado (unidades de ensayo confirmatorio OCDE o de depósito poroso). Se vierte la sustancia objeto del ensayo en el afluente (aguas residuales domésticas o sintéticas) de una de las unidades, mientras que la otra recibe tan sólo aguas residuales. Para la determinación de la biodegradación primaria con un análisis específico en el afluente y el efluente, sólo se utiliza una unidad.

Las concentraciones de COD (o DQO) se miden en los efluentes, o se determinan las concentraciones de sustancia por medio de un análisis específico.

El COD debido al material del ensayo no es medido sino simplemente especificado.

Cuando se realizan las mediciones de COG (o DQO), se supone que las diferencias entre las concentraciones medias de los efluentes del ensayo y del control se deben a material del ensayo no degradado.

Cuando se realizan análisis específicos, se pueden medir los cambios en la concentración de la molécula madre (biodegradación primaria).

Las unidades pueden manejarse siguiendo el «método de unidades acopladas», por medio de un procedimiento de transinoculación.

1.5. **Criterios de calidad**

La concentración inicial de la sustancia depende del tipo de análisis que se vaya a realizar y su limitación.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Preparación*

1.6.1.1. **Aparatos**

Se necesitan un par de unidades del mismo tipo, excepto cuando se realizan análisis específicos. Se pueden utilizar dos tipos de dispositivos:

La prueba confirmatoria OCDE:

El equipo (Anexo I) consiste en un recipiente de almacenaje (A) para las aguas residuales sintéticas, una bomba de dosificación (B), un recipiente de aireación (C), un separador (D), una bomba de aire (E) para reciclar el lodo activado y un recipiente (F) para recoger el efluente tratado.

Los recipientes (A) y (F) tienen que ser de vidrio o de un plástico apropiado y deben tener una capacidad de 24 litros por los menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas en el recipiente de aireación; se puede usar cualquier sistema conveniente, con tal que la corriente de entrada y la concentración queden aseguradas.

Durante el funcionamiento normal, se fija la altura del separador de modo que el volumen contenido en el recipiente de aireación sea de 3 litros de mezcla líquida. Se cuelga en el recipiente (C), en el vértice del cono, un cubo de aireación sintetizado (G). La cantidad de aire soplado a través del aireador puede controlarse por medio de un contador de corriente.

La bomba de aire (E) se coloca de manera que el lodo activado del separador sea continua y regularmente reciclado en el recipiente de aireación (C).

El depósito poroso:

El depósito poroso está construido a base de láminas de polietileno poroso (2 mm de espesor, tamaño máximo de los poros 95 µm), que adoptan la forma de cilindros de 14 cm de diámetro con una base cónica a 45° (Figuras 1 y 2 del Anexo II). El depósito poroso se encuentra en el interior de un recipiente impermeable, hecho de un plástico conveniente, de 15 cm de diámetro y con una salida a una altura de 17,2 cm en la parte cilíndrica, que determina el volumen (3 l) en el depósito. Hay un anillo rígido de soporte, hecho de un plástico conveniente, alrededor de la parte superior del recipiente interior, de modo que hay un espacio de 0,5 cm para el efluente entre el recipiente interior y el exterior.

Los depósitos porosos pueden montarse en la base de un baño maría termostáticamente regulado. Se suministra aire en la base del recipiente interior, en el que se colocan unos difusores apropiados.

Los recipientes (A) y (E) tienen que ser de vidrio o de un plástico conveniente y deben tener una capacidad de 24 litros por lo menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas al recipiente de aireación; puede usarse cualquier sistema apropiado, con tal que se asegure la corriente de entrada y la concentración.

Se necesitan depósitos porosos interiores de recambio para reemplazar a los que puedan bloquearse; los depósitos bloqueados se limpian por medio de una inmersión de 24 horas en una solución de hipoclorito seguida de un minucioso lavado con agua del grifo.

1.6.1.2. Filtración

Aparatos de filtración por membrana y filtros de membrana con poros de un tamaño de 0,45 µm. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración.

1.6.1.3. Aguas residuales

Se puede usar tanto afluente sintético apropiado como aguas residuales domésticas.

Ejemplo de afluente sintético:

disuélvase en cada litro de agua del grifo:

peptona	160 mg
extracto de carne	110 mg
urea	30 mg
NaCl	7 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg
K ₂ HPO ₄	28 mg.

Aguas residuales domésticas:

Deben recogerse frescas cada día en una cañería de desagüe de un tanque de sedimentación primaria de una planta de tratamiento que trate aguas residuales domésticas predominantemente.

1.6.1.4. Solución madre del material del ensayo

Debe prepararse una solución del material del ensayo (p. ej. 1 %) para ser añadida a la unidad en que se realiza el ensayo. La concentración del material tiene que determinarse, de modo que se conozca el volumen apropiado que hay que añadir a las aguas residuales o directamente a la unidad por medio de una segunda bomba, para obtener la concentración necesaria para el ensayo.

1.6.1.5. Inóculo

Nota: Cuando se utilizan aguas residuales domésticas, no vale la pena utilizar un inóculo de baja concentración bacterial, sino que se puede utilizar lodo activado.

Pueden utilizarse diversos inóculos.

Tres ejemplos de inóculos apropiados son:

a) Inóculo procedente de un efluente secundario:

El inóculo debe obtenerse a partir de un efluente secundario de buena calidad recogido en una planta de tratamiento que trate predominantemente aguas residuales domésticas. Hay que mantener el efluente en condiciones aeróbicas durante el tiempo que va desde la recogida de las muestras hasta su uso. Para preparar el inóculo, se filtra la muestra en un filtro poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que ser usado el mismo día que es recogido. Se deben usar por lo menos 3 ml para la inoculación.

b) Inóculo compuesto:

Inóculo procedente de un efluente secundario:

Véase la descripción anterior.

Inóculo procedente de suelo:

Se suspenden 100 g de suelo de jardín (fértil, no estéril) en 1 000 ml de agua potable sin cloro (Los suelos con una proporción extremadamente elevada de arcilla, arena o humus son inadecuados). Tras agitar la mezcla, se deja que la suspensión se deposite durante 30 minutos. Se filtra el sobrenadante con un filtro de papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. Se airea el líquido filtrado inmediatamente y hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Inóculo procedente de aguas superficiales:

Un tercer inóculo parcial se obtiene de aguas superficiales mesosapróbicas. La muestra se filtra con un papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Se reúnen y mezclan bien volúmenes iguales de las 3 muestras parciales de inóculo y se extrae de esta mezcla la muestra final. Deben usarse por lo menos 3 ml para la inoculación.

c) Inóculo procedente de lodo activado:

Se puede usar como inóculo un volumen (no más de 3 litros) de lodo activado (contenido de sólidos en suspensión de hasta 2,5 g/l) sacado del tanque de aireación de una planta que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

1.6.2. *Procedimiento*

El ensayo se realiza a temperatura ambiental; ésta debe mantenerse entre los 18 y los 25° C.

Si fuera apropiado, el ensayo puede realizarse a una temperatura inferior (de hasta 10° C): si la sustancia se degrada, entonces no es necesario ningún trabajo más. Si, sin embargo, la sustancia no se degrada, el ensayo debe llevarse a cabo a una temperatura constante entre los 18° y los 25° C.

1.6.2.1. *Período de rodaje: Formación/estabilización del lodo de las unidades*

El período de crecimiento/estabilización del lodo activado es el período durante el cual la concentración de los sólidos en suspensión del lodo activado y el funcionamiento de las unidades, progresan hasta llegar a un estado constante en las condiciones de explotación empleadas.

El período de rodaje es el período que va desde el momento en que la sustancia objeto de ensayo es añadida por primera vez hasta el momento en que su eliminación alcanza un trazado constante (valor relativamente constante). Este período no tiene que sobrepasar las seis semanas.

El período de evaluación es un período de tres semanas, tres semanas desde el momento en que la eliminación de la sustancia alcanza un valor relativamente constante, generalmente alto. Para aquellas sustancias que muestran escasa o nula degradación durante las primeras seis semanas, las tres semanas siguientes se consideran como el período de evaluación.

Al principio, lléne(n)se la(s) unidad(es) necesaria(s) para un ensayo con el inóculo mezclado con afluente.

Entonces se ponen en funcionamiento el aireador (y la bomba de aireación [E] en el caso de tener unidades de prueba confirmatoria OCDE) y el mecanismo de administración (B).

El afluente sin la sustancia tiene que pasar a través del recipiente de aireación (C) bien a la velocidad de un litro por hora, bien a la velocidad constante de medio litro por hora; esto da un tiempo medio de retención de tres o seis horas respectivamente.

La velocidad de aireación debe regularse de modo que el contenido del recipiente (C) se mantenga constantemente en suspensión, mientras el contenido de oxígeno disuelto es por lo menos de 2 mg/l.

Hay que evitar la formación de espuma de una manera apropiada. No hay que usar agentes antiespuma que inhiban el lodo activado.

El fango que se acumula alrededor de la parte superior del recipiente de aireación (C), (y, en el caso de las unidades de prueba confirmatoria OCDE, en la base del recipiente de sedimentación [D] y en el circuito de circulación) debe ser devuelto a la mezcla líquida al menos una vez al día rascando con un cepillo o de cualquier otro modo que resulte apropiado.

Cuando el fango no se sedimenta, puede aumentarse su densidad añadiendo porciones de 2 ml de una solución al 5 % de cloruro de hierro; repítase si fuera necesario.

El efluente se acumula en un recipiente (E o F) durante 20 a 24 horas, y se toma una muestra después de mezclarlo concienzudamente. Hay que limpiar el recipiente (E o F) cuidadosamente.

A fin de supervisar y controlar la eficiencia del proceso, se mide por lo menos dos veces a la semana la demanda química de oxígeno (DQO) o el carbón orgánico disuelto (COD) del líquido filtrado a partir del efluente acumulado, así como la del líquido filtrado a partir del efluente (utilizando una membrana de poros de tamaño 0,45 µm). Los primeros 20 ml (aproximadamente) del líquido filtrado se desechan.

La reducción del DQO o COD debe estabilizarse cuando se obtiene una degradación diaria más o menos regular.

El contenido de materia seca del lodo activado que está en el tanque de aireación debe determinarse dos veces a la semana (en g/l). Las unidades pueden operarse de dos maneras: bien se determina el contenido de materia seca del lodo activado dos veces a la semana y, si éste es superior a 2,5 g/l, se desecha el exceso de lodo activado; o bien se retiran cada día 500 ml de mezcla líquida, de cada depósito, para conseguir un tiempo medio de retención de seis días.

Cuando los parámetros [eficiencia del proceso (eliminación de DQO o COD), concentración del lodo, sedimentabilidad del lodo, turbidez de los efluentes, etc . . .] medidos y calculados de las dos unidades, son suficientemente constantes, se puede introducir la sustancia objeto de ensayo en el afluente de una de las dos unidades (como se indica en 1.6.2.2).

Por otra parte, la sustancia puede asimismo añadirse al principio del período de crecimiento del lodo (1.6.2.1) especialmente cuando el lodo es añadido en tanto que inóculo.

1.6.2.2. Procedimiento de ensayo

Se mantienen las condiciones de explotación del período de rodaje y se añade la suficiente cantidad de solución madre (aproximadamente el 1%) del material de ensayo afluente de la unidad en que se realiza el mismo, de modo que se obtenga la concentración deseada del material en las aguas residuales (aproximadamente 10 ó 20 mg de COD/l o 40 mg de DQO/l). Esto se puede lograr mezclando la solución de reserva con las aguas residuales diariamente o por medio de un sistema de bombeo separado. Esta concentración puede alcanzarse progresivamente. Si la sustancia objeto de ensayo no tiene efectos tóxicos sobre el lodo activado, se pueden probar concentraciones superiores.

Se alimenta el blanco sólo con afluente sin sustancias añadidas. Se toman para su análisis volúmenes suficientes de efluentes y se filtran con filtros de membrana (0,45 µm). Se desechan los primeros 20 ml (aproximadamente).

Las muestras filtradas tienen que analizarse el mismo día, si no, hay que preservarlas por medio de un método apropiado, por ejemplo, usando 0,05 ml de una solución de cloruro de mercurio al 1% por cada 10 ml de líquido filtrado o almacenándolas a 2 ó 4° C hasta 24 horas, o por debajo de los -18° C para períodos más largos.

El período de rodaje, con la adición de la sustancia a ensayar, no debe exceder las seis semanas y el período de evaluación no debe ser inferior a tres semanas, esto es, debe haber disponibles unas 14 ó 20 determinaciones para calcular el resultado final.

Método de unidades acopladas:

El acoplamiento de las unidades se consigue intercambiando 1,5 litros de mezcla líquida (incluido el lodo) de los recipientes de aireación del lodo activado entre las dos unidades una vez al día. Cuando los materiales de ensayo son fuertemente absorbentes, se sacan sólo 1,5 litros de líquido sobrenadante de los recipientes de sedimentación y se vierten en el recipiente de lodo activado de la otra unidad.

1.6.2.3. Análisis

Se pueden realizar dos tipos de análisis para examinar el comportamiento de la sustancia:

COD y DQO:

Las concentraciones de COD se realizan por duplicado con el analizador de carbón y/o los valores de DQO según la referencia bibliográfica 2.

Análisis específico:

Las concentraciones de la sustancia en estudio se determinan por medio de un método analítico apropiado. Cuando sea posible, se debe llevar a cabo la determinación específica de la sustancia absorbida en el lodo.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

2.1. Método de unidades acopladas

Cuando se utiliza el «método de unidades acopladas», los grados de eliminación diaria GE % se calculan de acuerdo con 1.2.1.

Estos grados de eliminación diaria GE son corregidos con la ecuación [2] para un tiempo medio de retención de tres horas y la ecuación [3] para seis horas, dando GE_c para la transferencia de material debida al procedimiento de transinoculación.

$$GE_c = \frac{8}{7} GE - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$GE_c = \frac{4}{3} GE - \frac{100}{3} \quad [3].$$

Se calcula la media de la serie de valores de GE_c , así como la desviación estándar de acuerdo con la ecuación [4]:

$$s_{GE_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{GE_c} - GE_{c_i})^2}{n-1}} \quad [4]$$

donde:

s_{GE_c} = Desviación estándar de la serie de valores de GE_c

$\overline{GE_c}$ = media de los valores de GE_c

n = número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de GE_c se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95 %, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de valores de DR_c una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [5]:

$$GE_c = \overline{GE_c} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{GE_c} \quad [5]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabular de t para n pares E y E_0 , y fiabilidad estadística P ($P = 1 - \alpha$), según la cual P se fija en un 95 % (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95 %, la respectiva desviación estándar y el número de valores de la serie DR_c , una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

$GE_c = 98,6 \pm 2,3\%$ de eliminación de COD

s = 4,65 % de eliminación de COD

n = 18

x = número de valores atípicos.

2.2. Modo de unidades no acopladas

El funcionamiento de las unidades puede controlarse como sigue:

$$\text{porcentaje de eliminación de DQO o COD} = \frac{\text{DQO o DOC de las aguas residuales} - \text{DQO o DOC del efluente}}{\text{DQO o COD de las aguas residuales}} \times 100$$

Estas eliminaciones diarias pueden trazarse gráficamente para revelar las tendencias, p. ej. a una aclimatación.

2.2.1. Cómo utilizar las determinaciones de DQO/COD

El grado diario de eliminación GE % se calcula según 1.2.1.

Se calcula la media de la serie de valores de GE , así como la desviación estándar de acuerdo con:

$$s_{GE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{GE} - GE_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

donde:

s_{GE} = Desviación estándar de la serie de valores de GE_i

\overline{GE} = Media de los valores de GE_i

n = Número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de GE se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95 %, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de los valores de GE una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [7]:

$$GE = \overline{GE} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{GE} \quad [7]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabular de t para n pares de valores de E y E_0 y fiabilidad estadística P ($P = 1 - \alpha$) según la cual P se fija en un 95 % (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95 %, la respectiva desviación estándar, y el número de valores de la serie GE una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

GE = (98,6 ± 2,3 %) de eliminación de COD

s = 4,65 % de eliminación de COD

n = 18

x = número de valores atípicos.

2.2.2. *Cómo utilizar un análisis específico*

El porcentaje de eliminación de la sustancia objeto de estudio en la fase acuosa (R_a) se calcula de acuerdo con 1.2.2.

3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- el formulario del Anexo III, indicando las condiciones de funcionamiento del ensayo
- qué aparato se eligió (prueba confirmatoria OCDE o depósito poroso)
- qué método se ha elegido: método de unidades acopladas o no
- qué aguas residuales: sintéticas o domésticas. En caso de que sean aguas residuales domésticas, fecha y lugar de la muestra
- qué inóculo, con fecha y lugar de la muestra
- una descripción del método analítico si se realizaron análisis específicos
- gráfico de la eliminación de DQO o COD en función del tiempo, incluyendo el período de rodaje y de evaluación
- recuperación analítica de la sustancia en estudio en forma de DQO o COD en la solución madre
- si se realizaron análisis específicos, gráfico del porcentaje de la eliminación de la sustancia de la fase acuosa en función del tiempo (período de rodaje y de evaluación)
- la media de eliminación de COD, DQO o de la sustancia y la desviación estándar se calculan a partir de los resultados del período de evaluación, es decir, cuando hay una eliminación constante de material del ensayo o un período de funcionamiento constante
- gráfico de la concentración de lodo activado en función del tiempo
- cualquier observación sobre el lodo activado (exceso de lodo desechado, presencia de aglomeraciones, $FeCl_3$, ...)
- concentración de la sustancia utilizada en el ensayo
- cualquier resultado sobre análisis realizados en el lodo
- toda la información y todos los resultados experimentales sobre la sustancia en estudio y la sustancia de referencia, si se utilizó alguna
- causas científicas de cualquier cambio de procedimiento.

3.2. Interpretación de los resultados

Una baja eliminación de la sustancia de estudio en la fase acuosa puede deberse a una inhibición de los microorganismos por parte de la sustancia. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida de lodo, produciendo un sobrenadante turbio, y a través de una reducción de la eficiencia en la eliminación de DQO (o COD) de la planta piloto.

La absorción físico-química puede desempeñar a veces un papel. Los análisis realizados en el lodo tras una adecuada desorción pueden revelar diferencias entre la acción biológica de la molécula y la absorción físico-química.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una distinción entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero la más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de grupo base (una prueba respirométrica preferentemente).

Si se observan eliminaciones elevadas de COD o DQO, entonces ello es debido a la biodegradación, mientras que, en el caso de eliminaciones reducidas, la biodegradación no se puede distinguir de la eliminación, p. ej., si un compuesto soluble da muestras de una absorción constante del 98 % y la proporción de excedente de fango retirado es del 10 % diario, una eliminación de hasta el 40 % es posible; con una proporción de excedente de lodo retirado del 30 %, la eliminación debida a la absorción y a la retirada con excedente de lodo puede llegar a ser del 65 % (referencia 4).

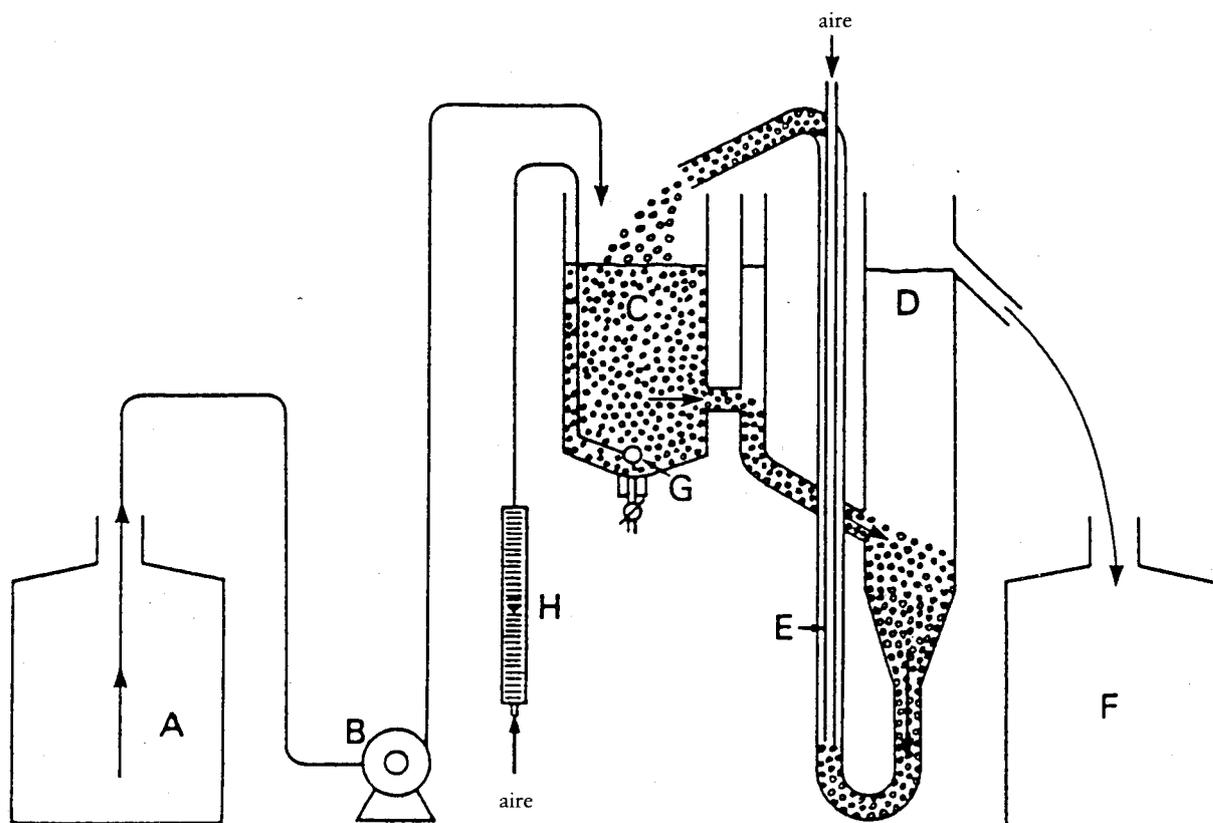
Cuando se utilicen análisis específicos, se debe prestar atención a la relación entre la estructura de la sustancia y el análisis específico empleado. En este caso, el fenómeno observado no puede ser interpretado como una mineralización de la sustancia.

4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 303 A*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Anexo V C 9 Prueba de degradación — Demanda de oxígeno químico. Directiva 84/449/CEE de la Comisión (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 251 de 19. 9. 1984).
- (3) Painter, H. A. y King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center Reino Unido.
- (4) Wierich, P. and Gerike, P., — «The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants» — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, nº 2. June 1981, p. 161a, 171.
- (5) Directivas 82/242/CEE y 82/243/CEE del Consejo (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 109 de 22. 4. 1982), corrigiendo las Directivas 73/404/CEE y 73/405/CEE: Biodegradabilidad de los detergentes (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 347 de 17. 12. 1973).
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980) 406-408.

Anexo 1

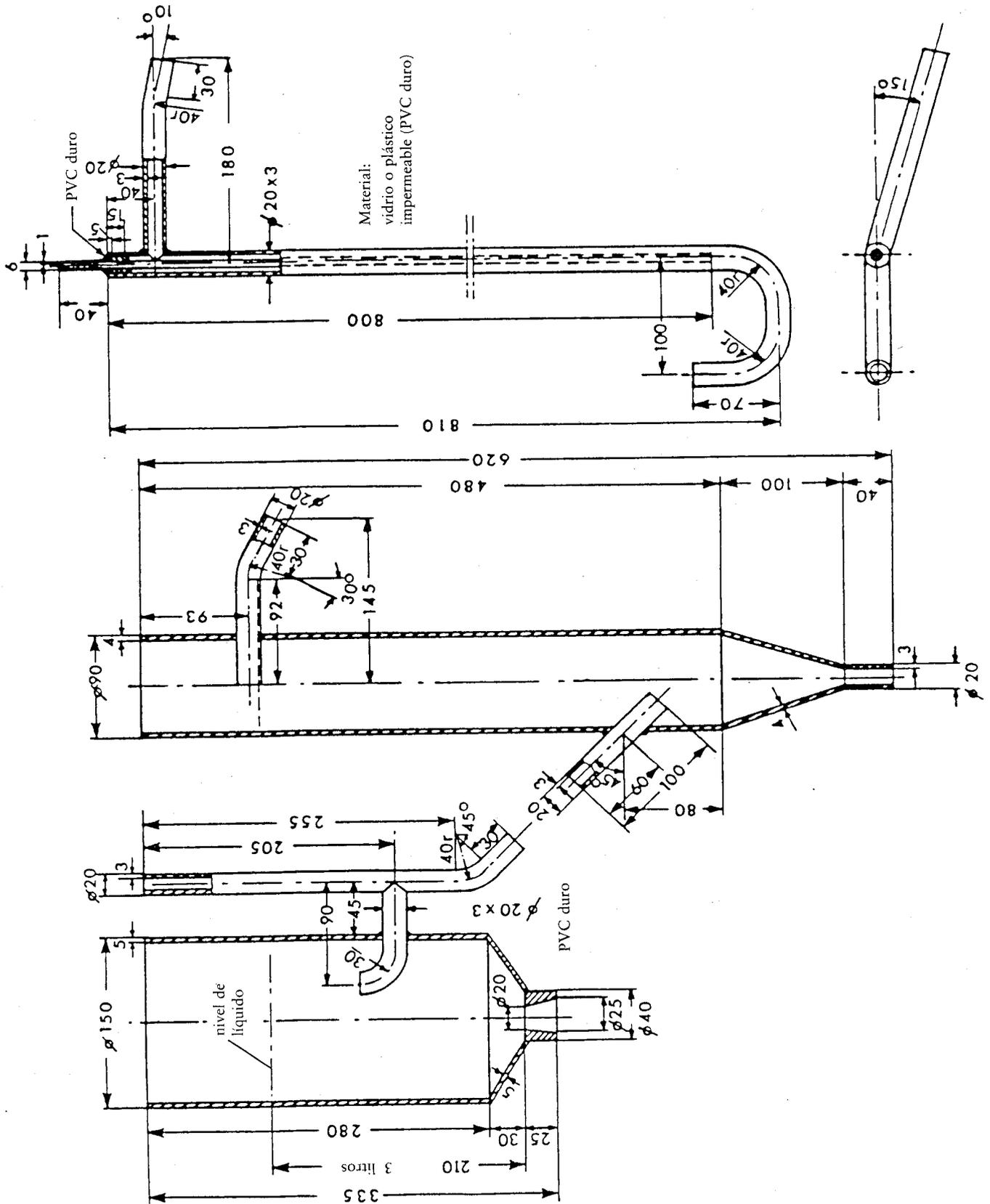
Figura 1



A = recipiente de almacenaje
B = mecanismo de administración
C = cámara de aireación
D = recipiente de sedimentación

E = bomba de aire
F = recipiente para recoger la sustancia
G = aireador
H = contador de corriente de aire (opcional).

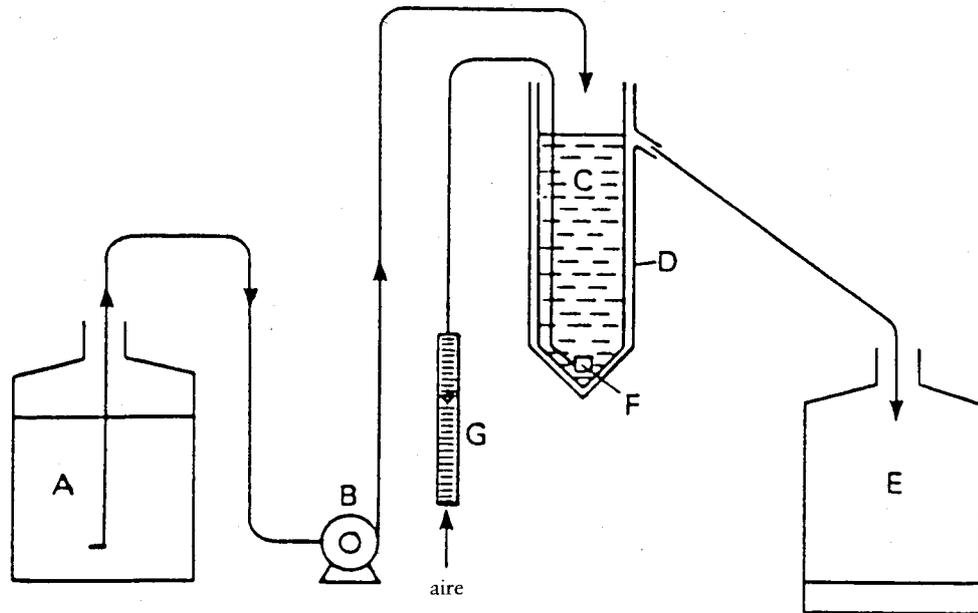
Figura 2



Anexo 2

Figura 1

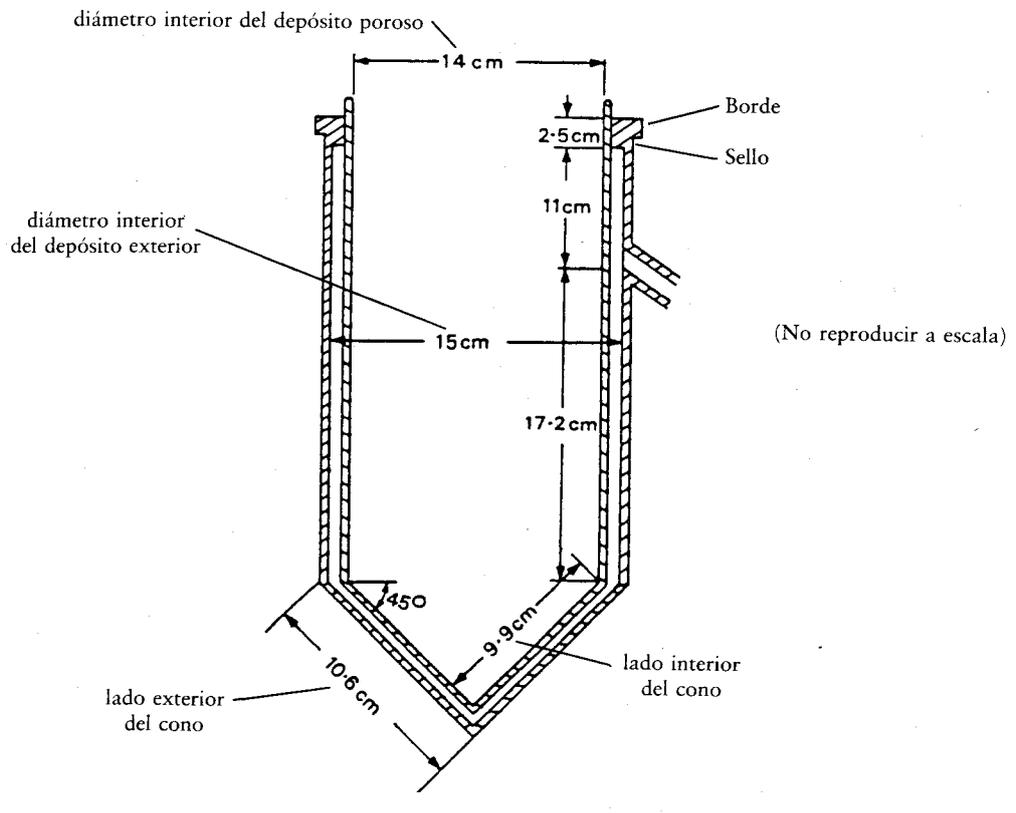
Equipo utilizado para valorar la biodegradabilidad



- | | |
|-------------------------------------|---|
| A = recipiente de almacenaje | E = recipiente para recoger el efluente |
| B = bomba de administración | F = aireador con piedra difusora |
| C = recipiente de aireación poroso | G = contador de corriente (opcional). |
| D = recipiente impermeable exterior | |

Figura 2

Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros



Anexo 3

Condiciones de funcionamiento del ensayo de simulación con lodo activado

Márquese la respuesta en cada grupo

Aparato

- confirmatorio OCDE
- depósito poroso

Método de funcionamiento

- unidad sencilla
- unidades acopladas
- unidades no acopladas

Transinoculación

- ninguna
- lodo activado
- sobrenadante

Tiempo medio de retención

- 3 horas
- 6 horas

Alimento de base

- aguas residuales domésticas
- aguas residuales sintéticas

Inóculo

- efluente secundario
- compuesto
- lodo activado

Adición del material de ensayo

- desde el principio
- incremento gradual
- tras la formación del lodo

Análisis

- específico
- DQO
- COD

BIODEGRADACIÓN

LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El método descrito en este Anexo sirve para evaluar el efecto que la sustancia objeto de ensayo tiene sobre los microorganismos, midiendo la tasa de respiración en unas condiciones determinadas y en presencia de concentraciones diferentes de la misma.

El propósito de este método consiste en establecer un método de investigación rápido por el que se puedan identificar las sustancias que afectan de manera adversa a las plantas de tratamiento microbiano aeróbico, así como indicar las concentraciones no inhibitorias apropiadas de las sustancias objeto de ensayo que vayan a ser utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad.

Una prueba preliminar puede realizarse antes de la prueba definitiva. Esta nos facilitará información acerca del rango de concentraciones que deben utilizarse en la prueba final.

Al proyectar la prueba se incluyen dos muestras control sin la sustancia objeto de ensayo, una al principio y otra al final de la serie de pruebas. Cada lote de lodo activado debe ser revisado utilizando una sustancia de referencia.

Este método es más fácilmente aplicable a sustancias que, debido a su solubilidad en agua y a su baja volatilidad, es probable que permanezcan en el agua.

Para sustancias con solubilidad limitada en el medio de prueba, puede que no sea posible la determinación del valor CE_{50} .

Cuando la sustancia de prueba es propensa a provocar la fosforilación oxidativa, los resultados basados en la disminución de oxígeno pueden conducir a conclusiones erróneas.

Para realizar el ensayo conviene disponer de la siguiente información:

- solubilidad en agua
- presión de vapor
- fórmula estructural
- pureza de la sustancia objeto del ensayo.

Recomendación:

El lodo activado puede contener organismos potencialmente patógenos; manéjese con cuidado.

1.2. Definiciones y unidades

La tasa de respiración es el consumo de oxígeno que tiene lugar en el lodo activado en condiciones aerobias por los microorganismos procedentes de aguas residuales; se expresa generalmente en mg O₂ por mg de lodo en una hora.

Para poder calcular el efecto inhibitorio de una sustancia de prueba a una determinada concentración, la tasa de respiración se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de las dos muestras control.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{C_1} + R_{C_2}}\right) \times 100 = \text{porcentaje de inhibición}$$

donde:

R_s = consumo de oxígeno de la sustancia de prueba a la concentración utilizada en el ensayo

R_{C_1} = consumo de oxígeno de la muestra control 1

R_{C_2} = consumo de oxígeno de la muestra control 2.

En este método el valor CE_{50} expresa la concentración de la sustancia de prueba en la que la tasa de respiración es el 50% de la obtenida en la muestra control, en las condiciones descritas en el método de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

Como sustancia de referencia, se recomienda utilizar 3,5-diclorofenol, conocido inhibidor de la respiración, efectuando una prueba para determinar el valor de CE_{50} en cada lote de lodo activado, a fin de comprobar que la sensibilidad del lodo no es anormal.

1.4. Principio del método

La tasa de respiración de un lodo activado alimentado con una cantidad estándar de agua residual sintética, se determina después de un tiempo de contacto de 30 minutos, o de tres horas, o de ambos. La tasa de respiración del mismo lodo activado se mide también en presencia de varias concentraciones de la sustancia de prueba y en condiciones idénticas. El efecto inhibitorio de la sustancia de prueba, a una determinada concentración, se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de dos muestras control. El valor de CE_{50} se calcula mediante determinaciones realizadas a diferentes concentraciones.

1.5. Criterios de calidad

Los resultados de la prueba son válidos si:

- las tasas de respiración de las muestras de control difieren una de la otra en menos de 15 %;
- el valor de CE_{50} (30 minutos y/o tres horas) del 3,5-diclorofenol está dentro de los límites aceptados de 5 a 30 mg/l.

1.6. Descripción del método**1.6.1. Reactivos****1.6.1.1. Soluciones de la sustancia de prueba**

Las soluciones de la sustancia objeto del ensayo se preparan en el momento de comenzar el estudio, usando una solución madre. Para esta solución, es apropiada una concentración de 0,5 gr/l, si se sigue el procedimiento recomendado más abajo.

1.6.1.2. Solución de la sustancia de control

Puede prepararse por ejemplo una solución de 3,5-diclorofenol disolviendo 0,5 g de 3,5-diclorofenol en 10 ml de NaOH, 1 M, diluyendo esta mezcla con agua destilada hasta un volumen de 30 ml aproximadamente, añadiendo a continuación y a la vez que se agita H_2SO_4 0,5 M hasta el punto de precipitación incipiente, para lo que se requieren 8 ml aproximadamente de H_2SO_4 0,5 M, y finalmente diluyendo la mezcla con agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de esta solución deberá estar entre 7 y 8.

1.6.1.3. Aguas residuales sintéticas

El agua residual sintética para alimentación de los lodos se obtiene disolviendo las siguientes cantidades de sustancias en un litro de agua:

- 16 g de peptona
- 11 g de extracto de carne
- 3 g de urea
- 0,7 g de NaCl
- 0,4 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,8 g de K_2HPO_4 .

Nota 1: Estas aguas residuales sintéticas están 100 veces más concentradas que las descritas en el Informe Técnico de la OCDE, «Método propuesto para la determinación de la biodegradabilidad de los tensoactivos utilizados en los detergentes sintéticos» del 11 de junio de 1976; además se les añade fosfato bipotásico.

Nota 2: Si el medio así preparado no va a utilizarse inmediatamente, deberá conservarse en la oscuridad y a una temperatura de 0 a 4° C, durante un período que no exceda de una semana y en condiciones que no provoquen cambio alguno en su composición. También puede esterilizarse antes de su conservación, o bien añadir los extractos de peptona y carne poco antes de efectuar la prueba. Antes de utilizar la solución, deberá mezclarse a fondo y regular su pH.

1.6.2. Aparato de medida

El dibujo exacto no es crítico. Sin embargo, no debe quedar espacio en la cabeza y la muestra debe encajar herméticamente en el cuello del frasco de medida.

Se necesita un equipamiento normal de laboratorio y, especialmente, lo siguiente:

- aparato de medida
- dispositivo de aireación
- electrodo de pH y equipo de medida
- electrodo de O_2 .

1.6.3. Preparación del inóculo

El inóculo microbiano para esta prueba proviene del lodo activado procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales predominantemente domésticas.

Si es necesario, al volver al laboratorio, pueden eliminarse las partículas gruesas o grumos dejando sedimentar un poco, por ejemplo durante 15 minutos, y decantando la capa superior de sólidos más finos para su uso. También puede mezclarse el lodo con un mezclador durante algunos segundos.

Si se piensa que puede hallarse presente material inhibitor, deberá lavarse el lodo con agua corriente o con una solución isotónica. Después de centrifugar se decanta el sobrenadante (Este procedimiento se repite tres veces).

Seguidamente, se pesa y se seca una pequeña cantidad de lodo lavado. A partir de estos resultados, se puede calcular la cantidad de lodo húmedo que debe ser suspendida en agua para obtener un lodo activado con un rango de concentración de sólidos en suspensión de 2 a 4 gr/L. Este nivel supone una concentración entre 0,8 y 1,6 gr/l en el medio de prueba, si se sigue el procedimiento recomendado más adelante.

Si no pudiera utilizarse el lodo el mismo día en que se ha recogido, se añadirán 50 ml de aguas residuales sintéticas a cada litro de lodo activado que haya sido preparado como se describe anteriormente; esta mezcla se airea durante la noche a una temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, y se mantiene en estas condiciones durante el día, preparado para su utilización. Antes de utilizarlo, se comprueba el pH y, si es necesario, éste se ajusta hasta un valor de entre 6,0 y 8,0. El nivel de sólidos en suspensión se determina como se describe en el párrafo anterior.

Si en días posteriores (cuatro como máximo), es necesario utilizar el mismo lote de lodo, se le añaden 50 ml de aguas residuales sintéticas por litro de lodo al final de cada día de trabajo.

1.6.4. Realización de la prueba

Duración/tiempo de contacto: 30 minutos y/o tres horas, tiempo durante el cual tiene lugar la aireación.

Agua: Agua potable (si es necesario, clorada).

Suministro de aire: Aire limpio, sin aceite. Caudal de aire de 0,5 a 1 litro/minuto.

Aparato de medida: Matraz de fondo plano, como por ejemplo, un frasco DBO (véase la figura 1).

Medidor de oxígeno: Electrodo de oxígeno adecuado, con un registrador.

Solución nutritiva: Aguas residuales sintéticas (véase más arriba).

Sustancia de prueba: La solución de prueba se prepara en el momento de comenzar la prueba.

Sustancia de referencia: Por ejemplo, 3,5-diclorofenol (tres concentraciones como mínimo).

Muestra de control: Muestra inoculada sin sustancia de prueba.

Temperatura: $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

A continuación se sugiere un procedimiento experimental, que puede seguirse para ambas sustancias, la de prueba y la de referencia, y para un período de contacto de tres horas:

Se utilizan varios recipientes (por ejemplo, vasos de precipitado de 1 litro).

Se usarán como mínimo cinco concentraciones, distanciadas por un factor constante que, preferiblemente, no exceda de 3,2.

A tiempo «O», se mezclan 16 ml de cultivo de aguas residuales sintéticas con agua, hasta obtener 300 ml, a los que se añaden 200 ml de inóculo microbiano, y la mezcla total (500 ml) se vierte en el primer recipiente (primera muestra de control, C₁). Los recipientes de la prueba deberán airearse continuamente para asegurar que el O₂ disuelto no se hace menor de 2,5 mg/l y que, justo antes de la medida de la tasa de respiración, la concentración de O₂ deberá ser de unos 6,5 mg/l.

A los 15 minutos (15 minutos es un intervalo arbitrario, aunque conveniente), se repite el procedimiento anterior, con la diferencia de que, antes de añadir agua hasta llegar a 300 ml e inóculo microbiano hasta obtener un volumen de 500 ml, se añaden 100 ml de la solución madre de sustancia de prueba a los 16 ml de aguas residuales sintéticas. Seguidamente, esta mezcla se vierte en un segundo recipiente y se airea como se ha expuesto anteriormente. Este proceso se repite a intervalos de 15 minutos con diferentes volúmenes de solución madre de sustancia de prueba, para obtener una serie de recipientes que contengan concentraciones diferentes de la sustancia de prueba. Finalmente, se prepara una segunda muestra de control (C₂).

Después de tres horas se mide el pH y se vierte bien mezclado el contenido del primer recipiente en el aparato de medida, en el que se mide la tasa de respiración durante un período de hasta 10 minutos.

Esta determinación se repite a intervalos de 15 minutos con el contenido de cada recipiente, de tal manera que el tiempo de contacto de cada recipiente sea de tres horas.

La sustancia de referencia se prueba en cada lote de inóculo microbiano siguiendo el mismo procedimiento.

Cuando vayan a tomarse las medidas después de 30 minutos de contacto, se necesitará un régimen diferente (por ejemplo, más de un medidor de oxígeno).

Cuando sea necesario medir el consumo químico de oxígeno, se preparan más recipientes que contengan la sustancia de prueba, el medio nutriente de aguas residuales sintéticas y agua, pero no lodo activado.

El consumo de oxígeno se mide y se registra después de un tiempo de aireación de 30 minutos y/o de tres horas (tiempo de contacto).

2. DATOS Y EVALUACIÓN

La tasa de respiración se calcula a partir del trazado del registrador en mg O₂/l.h, con valores aproximados de entre 6,5 mg O₂/l y 2,5 mg O₂/l, o cuando la tasa de respiración sea baja, durante un período de 10 minutos. La parte de la curva de respiración sobre la que se mide la tasa de respiración debe ser lineal.

Cuando las tasas de respiración de las dos muestras de control difieran en más del 15 por ciento o el valor de CE₅₀ (30 minutos y/o tres horas) de la sustancia de referencia no quede dentro de la gama aceptada (de 5 a 30 mg/l para el 3,5-diclorofenol), la prueba no será válida y deberá repetirse.

El porcentaje de inhibición se calcula para cada concentración de prueba como se ha descrito anteriormente, y se representa gráficamente en función de la concentración en un papel logarítmico normal (o logaritmo-probabilidad), para obtener el valor de CE₅₀.

Los límites de confianza del 95 % de los valores de CE₅₀ se pueden determinar usando procedimientos establecidos.

3. INFORMES

3.1. Informe de la prueba

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- sustancia de prueba: datos de identificación química
- sistema de prueba: fuente, concentración y cualquier tratamiento previo del lodo activado
- condiciones de la prueba:
 - pH de la mezcla de reacción antes de la medición de la respiración
 - temperatura de prueba
 - duración de la prueba
 - sustancia de referencia y su valor medido de CE₅₀
 - absorción abiótica de oxígeno (si la hubiere)
- resultados:
 - todos los datos medidos
 - curva de inhibición y método para calcular el valor de CE₅₀
 - valor de CE₅₀ y, si es posible, límites de confianza del 95%, CE₂₀ y CE₈₀.
 - todas las observaciones y cualquier desviación de este método de prueba que pueda haber influido sobre el resultado.

3.2. Interpretación de los datos

El valor de CE₅₀ se considerará solamente como indicación de los probables efectos tóxicos de la sustancia de prueba sobre los microorganismos de aguas residuales o de depuración de lodo activado, si se tiene en cuenta que las complejas interacciones que ocurren en el medio ambiente no pueden ser simuladas con precisión de una prueba de laboratorio. Además, las sustancias de prueba que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la oxidación amónica pueden producir también curvas de inhibición atípicas. En razón de esto, dichas curvas deberán interpretarse con cautela.

4. REFERENCIAS

- (1) International Standard ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).
- (3) Brown, D., Hitz, H. R., and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, also described by:
- (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).
- (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 247 (1977).
- (7) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 209*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

BIODEGRADACIÓN

PRUEBA LASC MODIFICADA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método es la evaluación del potencial de biodegradabilidad última o total de sustancias orgánicas hidrosolubles y no volátiles, cuando se exponen a concentraciones relativamente altas de microorganismos durante un largo período de tiempo. Se mantiene durante este período la viabilidad de los microorganismos añadiendo diariamente una alimentación de aguas residuales decantadas. Para las necesidades del fin de semana, pueden almacenarse las aguas residuales a 4 ° C. Pueden emplearse como alternativa las aguas residuales sintéticas de la prueba de confirmación OCDE.

Puede producirse una absorción fisicoquímica sobre los sólidos en suspensión, y este hecho deberá tomarse en cuenta al interpretar los resultados (véase 3.2).

Debido al largo período de retención de la fase líquida (36 horas) y a la adición intermitente de nutrientes, la prueba no simula las condiciones reinantes en una planta depuradora de aguas residuales. Los resultados obtenidos con diversas sustancias de prueba indican que la prueba tiene un elevado potencial de biodegradación.

Las condiciones que la prueba establece son muy favorables a la selección y/o adaptación de microorganismos capaces de degradar el compuesto de prueba (El procedimiento puede utilizarse también para obtener inóculos aclimatados destinados a emplearse en otras pruebas).

En este método se emplea la medida de la concentración del carbono orgánico disuelto para evaluar la biodegradabilidad total de las sustancias de prueba. Resulta preferible determinar el COD por acidificación y purgado más que por la diferencia de $C_{\text{total}} - C_{\text{inorgánico}}$.

El empleo simultáneo de un método analítico específico puede permitir también evaluar la degradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas de prueba que, a la concentración empleada en la prueba,

- sean solubles en agua, (como mínimo, 20 mg de carbono orgánico disuelto/L)
- posean una presión de vapor despreciable
- no posean efecto inhibitor sobre las bacterias
- no se absorban significativamente dentro del sistema de prueba
- no escapen de la solución de prueba por formación de espumas.

Deberá determinarse el contenido de carbono orgánico del material de prueba.

Para interpretar los resultados obtenidos, será útil la información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de prueba, particularmente en los casos para los que los resultados sean bajos o marginales.

Para la interpretación de resultados bajos y para la selección de una concentración de prueba idónea podrá ser útil la información sobre la toxicidad de la sustancia de prueba para los microorganismos.

1.2. Definiciones de unidades

C_T = concentración del compuesto de prueba como carbono orgánico presente o añadido a las aguas residuales sedimentadas al comienzo del período de aireación (mg/l).

C_t = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante de la prueba al término del período de aireación (mg/l)

C_c = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante del control al término del período de aireación (mg/l).

En este método, la biodegradación se define como la desaparición del carbono orgánico. La biodegradación puede expresarse como:

1. La eliminación porcentual D_{ad} de la cantidad de sustancia añadida diariamente:

$$D_{ad} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

D_{ad} = degradación/adición diaria.

2. La eliminación porcentual D_{sid} de la cantidad de sustancia presente al inicio de cada día:

$$D_{sid} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 b)]$$

D_{sid} = degradación/substancia al inicio del día.

Donde los índices i y $(i + 1)$ se refieren al día de la medición. Se recomienda la ecuación [2 a)] si el COD efluente varía de día a día, mientras que la ecuación [2 b)] puede emplearse cuando el COD efluente permanezca relativamente constante de un día para otro.

1.3. Sustancias de referencia

En algunos casos, al investigar una sustancia nueva, serán útiles las sustancias de referencia; sin embargo, no se recomienda en el método ninguna sustancia de referencia específica.

Se proporcionan los datos de diversos compuestos evaluados en pruebas efectuadas en varios laboratorios (véase Anexo 1). En principio esto puede ser llevado a cabo periódicamente como calibración del método y para comparar los resultados obtenidos cuando se emplea un método distinto.

1.4. Principio del método de la prueba

Se coloca en una unidad de lodo activado semicontinuo (LASC) lodo activado procedente de una planta depuradora de aguas residuales. Se añaden el compuesto de prueba y aguas residuales domésticas decantadas, aireándose la mezcla durante 23 horas. Se interrumpe entonces la aireación, permitiéndose que el lodo se deposite por sedimentación y retirándose el líquido sobrenadante.

Se mezcla a continuación el lodo que permanece en la cámara de aireación con una cantidad igual del compuesto de prueba y de aguas residuales, repitiéndose el ciclo.

La biodegradación se determina por el contenido en carbono orgánico disuelto del líquido sobrenadante. Se compara dicho valor con el obtenido en un tubo de control en el que se han introducido sólo aguas residuales decantadas.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

1.5. Criterios de calidad

No ha sido bien establecida aún la reproducibilidad de este método basado en la eliminación del carbono orgánico disuelto (Cuando se considera la biodegradación primaria, se obtienen datos muy precisos para las sustancias degradadas en gran medida).

La sensibilidad del método viene determinada en gran parte por la variabilidad del control y, en menor grado, por la precisión de la determinación del carbono orgánico disuelto y por el contenido del compuesto de prueba en el líquido al comienzo de cada ciclo.

1.6. Descripción del procedimiento de la prueba

1.6.1. Preparativos

Se reúne un número suficiente de unidades limpias de aireación (también puede usarse alternativamente la unidad original de prueba LASC de 1,5 l) y de tubos de entrada de aire (figura 1) para cada sustancia de prueba y para los controles. El aire comprimido suministrado a las unidades de prueba, que se purifica pasándolo por un filtro de lana de algodón, debe hallarse exento de carbono orgánico y presaturado con agua, a fin de reducir las pérdidas por evaporación.

Se toma una muestra de líquido mixto, que contenga de 1 a 4 g de sólidos en suspensión por litro de una central depuradora de lodo activado en la que se depuren sobre todo aguas residuales domésticas. Para cada unidad de aireación se requieren aproximadamente 150 ml de líquido mixto.

Se preparan en agua destilada soluciones madre de la sustancia de prueba; la concentración exigida normalmente es de 400 mg/l como carbono orgánico, lo que supone una concentración del compuesto de prueba de 20 mg/l de carbono al inicio de cada ciclo de aireación, si no tiene lugar una biodegradación.

Pueden emplearse concentraciones más altas si la toxicidad frente a los microorganismos lo permite.

Se mide el contenido en carbono orgánico de las soluciones madre.

1.6.2. *Condiciones de la prueba*

La prueba deberá llevarse a cabo a 20 a 25° C.

Se utiliza una concentración elevada de microorganismos aerobios (de 1 a 4 g/l de sólidos en suspensión), y el período efectivo de retención es de 36 horas.

La materia carbonada existente en las aguas residuales que sirven de alimentación resulta oxidada en gran medida, normalmente al cabo de 8 horas tras el inicio de cada ciclo de aireación. A continuación, el lodo respira endógenamente durante el resto del período de aireación, siendo entonces el compuesto de prueba el único sustrato disponible, a menos que éste resulte también rápidamente metabolizado. Estos factores, junto con el de la reinoculación diaria de la solución de prueba cuando se utilizan como medio aguas residuales domésticas, ofrecen condiciones muy favorables para que se produzcan la aclimatación y un alto grado de biodegradación.

1.6.3. *Ejecución de la prueba*

Se toma una muestra de líquido mixto de una estación de depuración de lodo activado predominantemente de origen doméstico, o bien de un laboratorio, y se mantiene en condiciones aerobias hasta emplearla en el laboratorio. Se llena cada unidad de aireación, y la unidad de control, con 150 ml (si se utiliza la unidad original de prueba LASC, deben multiplicarse los volúmenes dados por 10) de líquido mixto, y se da inicio a la aireación. Transcurridas 23 horas, se interrumpe la aireación y se permite que el lodo sedimente durante 45 minutos. Se abre sucesivamente la espita de cada recipiente, y se retiran de cada uno 100 ml del líquido sobrenadante. Se toma, inmediatamente antes de su uso, una muestra de aguas residuales domésticas decantadas y se añaden 100 ml al lodo que permanece en cada unidad de aireación. Se vuelve a comenzar la aireación. En esta fase no se añaden sustancias de prueba, y las unidades se alimentan diariamente con aguas residuales domésticas sólo hasta que se obtenga un líquido sobrenadante transparente después de la decantación. El tiempo necesario para ello es por lo general de 2 semanas, transcurridas las cuales el carbono orgánico disuelto contenido en el líquido sobrenadante al término de cada ciclo de aireación se acerca a un valor constante.

Al término de este período, se mezclan los diferentes lodos decantados, y se añaden a cada unidad 50 mL del lodo compuesto resultante.

Se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de agua a las unidades control; por su parte, a las unidades de ensayo se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de la solución madre (400 mg/l) del compuesto en estudio. Se recommienza la aireación y se mantiene durante 23 horas. Se deja entonces que el lodo decante durante 45 minutos, recogiendo a continuación el líquido sobrenadante y analizándose el mismo, a fin de establecer su contenido en carbono orgánico disuelto.

Se repite diariamente durante toda la duración de la prueba el procedimiento mencionado de llenado y recogida.

Antes de la sedimentación, puede resultar necesario limpiar las paredes de las unidades para impedir que se acumulen sólidos por encima del nivel de líquido. Se utiliza para cada unidad un raspador o un cepillo individual, a fin de impedir que se produzca una contaminación cruzada.

Idealmente, el carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes se determinará diariamente, aunque puede permitirse una frecuencia menor de análisis. Antes de efectuar el análisis, se filtran los líquidos a través de filtros de membrana de 0,45 µm lavados o se centrifugan los mismos. Los filtros de membrana son adecuados si es seguro que ni liberan carbono ni absorben sustancia en la fase de filtración. La temperatura de la muestra no debe superar los 40 °C mientras se halle dentro de la centrífuga.

La duración de la prueba para compuestos con poca o ninguna degradación es indeterminada, pero la experiencia sugiere que generalmente debería alcanzar al menos 12 semanas, sin superar las 26.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

Se representan en un diagrama frente al tiempo, los valores del carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes de las unidades de prueba y de las unidades de control.

Según se va produciendo la biodegradación, el nivel encontrado en la muestra se aproximará al nivel del control. Una vez que la diferencia entre los dos niveles resulta constante para tres medidas consecutivas, se efectúa el número de medidas adicionales que sea suficiente para permitir el tratamiento estadístico de los datos, y se calcula con ellos la biodegradación porcentual del compuesto de prueba (D_{ad} o D_{sid} , véase 1.2).

3. INFORME

3.1. Informe de la prueba

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- toda la información sobre el tipo de aguas residuales, el tipo de unidad empleado y los resultados experimentales relativos a la sustancia probada, la sustancia de referencia (si se usa), y el control
- la temperatura
- la curva de eliminación, con descripción y método de cálculo (véase 1.2)
- la fecha y el emplazamiento donde se tomó la muestra del lodo activado y de las aguas residuales, el estado de adaptación, concentración, etc.
- razones científicas para efectuar cualquier modificación del procedimiento de la prueba
- firma y fecha.

3.2. Interpretación de los resultados

Dado que la sustancia que deberá probarse con este método no será fácilmente biodegradable, toda eliminación del COD debida exclusivamente a la biodegradación será normalmente gradual, extendiéndose durante días o semanas, excepto en los casos en los que la aclimatación sea brusca, como indica una desaparición abrupta que tenga lugar tras algunas semanas.

Sin embargo, la absorción fisicoquímica puede jugar en ocasiones un papel importante; esto se apreciará cuando se produzca desde el principio una eliminación completa o parcial del COD añadido. Lo que sucede a continuación depende de factores tales como los grados de absorción y la concentración de sólidos en suspensión en la descarga del efluente. Generalmente, la diferencia entre las concentraciones del COD en los líquidos de control y en los líquidos sobrenadantes de la prueba se incrementa gradualmente a partir de un valor inicial bajo, permaneciendo a continuación con el nuevo valor durante el resto del experimento a menos que tenga lugar la aclimatación.

Si debe llevarse a cabo una distinción entre la biodegradación (o la biodegradación parcial) y la absorción, son necesarias otras pruebas. Estas pueden efectuarse de diversas maneras, pero la más convincente consiste en utilizar el líquido sobrenadante, o el lodo, como inóculo para una prueba de grupo base (preferiblemente una prueba respirométrica).

Las sustancias de prueba que produzcan una eliminación alta y no adsorptiva del COD en esta prueba deberán considerarse como potencialmente biodegradables. La eliminación parcial y no adsorptiva indica que el producto químico experimenta al menos algo de biodegradación.

Las eliminaciones bajas o nulas del COD pueden ser debidas a que la sustancia de prueba tiene efecto inhibitor sobre los microorganismos, y esto puede quedar de manifiesto también por lisis y pérdida de lodo, produciéndose sobrenadantes turbios. En este caso, deberá repetirse la prueba empleando una concentración menor de la sustancia de prueba.

El empleo de un método analítico específico, o de una sustancia de prueba marcada con ^{14}C puede proporcionar una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de prueba marcado con ^{14}C , la recuperación de $^{14}\text{CO}_2$ confirmará que ha tenido lugar la biodegradación.

Cuando los resultados se expresen también en términos de biodegradación primaria, deberá explicarse también, si ello es posible, el cambio en la estructura química que produce la pérdida de respuesta de la sustancia inicial de prueba.

Deberá indicarse la validación del método analítico junto con la respuesta encontrada con el medio del control.

4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 A*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

Anexo 1

Prueba LASC: Ejemplo de resultados

Sustancia	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Porcentaje de biodegradación (D_{ad})	Duración del ensayo (días)
4-acetil aminobenceno sulfonato	17,2	2,0	85,0	40
Tetra propilen benceno sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenil	16,9	0,8	95,3	40
Dietil glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetra ciclopentano carboxilato	17,9	3,2	81,1	120

Anexo 2

Ejemplo del aparato de ensayo

Figura 1

