

Bruselas, 25 de febrero de 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTA DE TRANSMISIÓN

De:	Comisión Europea
Fecha de recepción:	22 de febrero de 2019
A:	Secretaría General del Consejo
N.º doc. Ción.:	Anexo del D060575/02
Asunto:	Anexo del REGLAMENTO (UE) .../... DE LA COMISIÓN de XXX que modifica, con vistas a su adaptación al progreso técnico, el anexo del Reglamento (CE) n.º 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH)

Adjunto se remite a las Delegaciones el documento – Anexo del D060575/02.

Adj.: Anexo del D060575/02

ES

ANEXO

El anexo del Reglamento (CE) n.º 440/2008 queda modificado como sigue:

- 1) En la parte B, el capítulo B.4 se sustituye por el texto siguiente:

«B.4. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA**INTRODUCCIÓN**

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 404 de la OCDE (2015). Las directrices de ensayo de la OCDE para los ensayos de productos se revisan periódicamente a fin de garantizar que reflejan los mejores conocimientos científicos disponibles. En la revisión de las TG 404 de la OCDE, se ha prestado atención especial a las posibles mejoras en relación con las cuestiones del bienestar de los animales y con la evaluación de toda la información existente sobre el producto problema, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias. La versión actualizada de las TG 404 de la OCDE (adoptadas originalmente en 1981, revisadas en 1992, 2002 y 2015) incluye una referencia al documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment) en relación con la irritación/corrosión cutánea (1), que propone un enfoque modular para el ensayo de la irritación cutánea y de la corrosión cutánea. Los IATA describen varios módulos que agrupan las fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aportan orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) proponen un enfoque cuando se precisan más ensayos (1). Además, en caso necesario, se recomienda en dicho documento la aplicación sucesiva, y no simultánea, de los tres parches de ensayo a los animales en el ensayo *in vivo* inicial.
2. Las definiciones de irritación y corrosión cutánea se indican en el apéndice del presente método de ensayo.

CONSIDERACIONES INICIALES

3. En aras tanto del rigor científico como del bienestar de los animales, no debe considerarse la realización de ensayos *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos disponibles relativos a la capacidad de corrosión/irritación ocular del producto problema mediante un

análisis de ponderación de las pruebas, como se indica en el documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación en relación con la irritación/corrosión cutánea, a saber, en las tres partes de este documento y sus módulos correspondientes (1). En resumen, con arreglo a la parte 1, los datos disponibles se tratan a lo largo de siete módulos relativos a los datos obtenidos con seres humanos, datos *in vivo*, datos *in vitro*, datos sobre propiedades físico-químicas (p. ej., pH, en particular acidez o alcalinidad fuertes) y métodos no experimentales. Con arreglo a la parte 2, se realiza un análisis de ponderación de las pruebas. Si esta ponderación de las pruebas sigue sin ser concluyente, debe aplicarse la parte 3, con ensayos adicionales, empezando con métodos *in vitro* y utilizando los métodos *in vivo* solo como último recurso. Por tanto, este análisis debe reducir la necesidad de realizar ensayos *in vivo* de la corrosión/irritación cutánea de los productos problema de los que ya se disponga de pruebas suficientes obtenidas con otros estudios efectuados sobre esos dos criterios de valoración.

PRINCIPIO DEL ENSAYO *IN VIVO*

4. El producto problema se aplica en una sola dosis a la piel de un animal de experimentación; sirven de control las zonas sin tratar de la piel del animal de ensayo. Se observa y puntúa el grado de irritación/corrosión a intervalos determinados, y luego se describe para la completa evaluación de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.
5. Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados de forma compasiva, con la consiguiente evaluación del producto problema. Los criterios para tomar la decisión de sacrificar de forma compasiva los animales moribundos y que sufren intensamente son objeto de otro documento de orientación de la OCDE (2).

PREPARACIÓN DEL ENSAYO *IN VIVO*

Selección de la especie animal

6. El animal de laboratorio que se prefiere es el conejo albino; se utilizan adultos jóvenes sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

Preparación de los animales

7. Aproximadamente 24 horas antes del ensayo se afeita el pelo apurando bien en la zona dorsal del tronco de los animales. Se ha de tener cuidado para no erosionar la piel, y solo se deben utilizar animales con piel sana e intacta.
8. Algunas razas de conejo tienen densas placas de pelo que son más prominentes en determinadas épocas del año. Dichas zonas no deben utilizarse para realizar los ensayos.

Condiciones de alojamiento y alimentación

9. Los animales deben alojarse de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 °C (± 3 °C) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo, y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Aplicación del producto problema

10. El producto problema debe aplicarse a una pequeña zona de piel (de unos 6 cm²), que se cubrirá con una gasa, la cual se sujetará con esparadrapo no irritante. Cuando no sea posible la aplicación directa (por ejemplo, líquidos o algunas pastas), el producto problema se aplicará primero a la gasa, que se aplicará a continuación a la piel. La gasa debe mantenerse en contacto con la piel, sin apretar, por medio de un apósito semioclusivo apropiado durante todo el período de exposición. Si se aplica el producto problema a la gasa, esta debe sujetarse a la piel de forma que el contacto sea bueno y el producto problema se distribuya de manera uniforme sobre la piel. Se evitará que el animal tenga acceso a la gasa y que pueda comerse o inhalar el producto problema.
11. Los productos problema líquidos se emplean por lo general sin diluir. En caso de que sea sólido (que se podrá pulverizar si se considera necesario), el producto problema se humedecerá con el mínimo de agua (u otro vehículo adecuado, si se considera necesario), que garantice un buen contacto con la piel. Si se utilizan vehículos distintos del agua, ha de ser mínima o nula la posible influencia del vehículo sobre la irritación cutánea debida al producto problema.
12. Finalizado el período de exposición, que normalmente es de 4 horas, se eliminarán los residuos del producto problema cuando ello sea posible, con agua o con un disolvente adecuado que no altere la respuesta producida ni la integridad de la epidermis.

Posología

13. Se pondrá una dosis de 0,5 ml de líquido o de 0,5 g de sólido o pasta en el punto de aplicación.

Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión cutánea *in vivo* con un solo animal)

14. En los casos en que un producto problema se haya considerado corrosivo, irritante o no clasificado sobre la base de análisis de ponderación de las pruebas o de ensayos previos *in vitro*, normalmente no es necesario efectuar más ensayos *in vivo*. No obstante, en los casos en que se piense que está justificado obtener datos adicionales, se realizará el ensayo *in*

vivo utilizando inicialmente un solo animal y aplicando el siguiente planteamiento. Se utilizan secuencialmente hasta tres parches de ensayo con el animal. El primero se retira a los tres minutos. Si no se observa ninguna reacción cutánea grave, se utiliza un segundo parche en un lugar diferente y se retira al cabo de una hora. Si en este momento las observaciones indican que desde un punto de vista humanitario se puede aumentar la exposición hasta cuatro horas, se aplica un tercer parche que se retira al cabo de cuatro horas, y se clasifica la respuesta.

15. Si tras alguna de las tres exposiciones secuenciales se observa un efecto corrosivo, se suspende el ensayo inmediatamente. Si una vez retirado el último parche no se observa efecto corrosivo, se somete a observación al animal durante 14 días, a menos que aparezca corrosión antes.
16. En los casos en que no esté previsto que el producto problema sea corrosivo pero sí pueda ser irritante, se pondrá un solo parche a un solo animal durante cuatro horas.

Ensayo de confirmación (ensayo de irritación cutánea *in vivo* con animales adicionales)

17. Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo, se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, cada uno con un parche, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, el ensayo de confirmación puede hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez. En el caso excepcional de que no se realice el ensayo inicial, se podrán tratar dos o tres animales con un solo parche, que se retirará al cabo de cuatro horas. Cuando se utilicen dos animales, no será necesario realizar más ensayos si ambos muestran la misma respuesta. En caso contrario, se someterá a ensayo el tercer animal. Si la respuesta es dudosa, puede ser necesario evaluarla utilizando más animales.

Período de observación

18. La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante, se dará por finalizado el experimento si en cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar intensos. Para determinar la reversibilidad de los efectos los animales serán sometidos a observación durante hasta 14 días a partir de la retirada de los parches. Si se observa la irreversibilidad antes de 14 días, el experimento debe finalizar en ese momento.

Observaciones clínicas y graduación de las reacciones cutáneas

19. En todos los animales se examinarán los signos de eritema y edema, puntuándose las repuestas al cabo de 60 minutos, y de 24, 48 y 72 horas de la retirada del parche. En cuanto al ensayo inicial con un solo animal, la zona de ensayo también se examina inmediatamente después de retirar el parche. Las reacciones cutáneas se clasifican y registran conforme a los grados del cuadro siguiente. Si al cabo de 72 horas hay una lesión

cutánea que no se puede considerar como irritación o corrosión, quizá sea necesario observarla hasta el día 14 para determinar la reversibilidad de los efectos. Además de observar la irritación, se debe realizar una descripción completa y el registro de todos los efectos tóxicos locales, como la destrucción de la grasa de la piel, y de cualquier efecto adverso sistémico (por ejemplo, los efectos sobre los signos clínicos de toxicidad y el peso corporal). Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para aclarar respuestas dudosas.

20. La clasificación de las respuestas cutáneas es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal clasificación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado de estas recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado (véase el cuadro siguiente). Puede ser útil disponer de una guía ilustrada para clasificar la irritación cutánea y otras lesiones (3).

DATOS E INFORME

21. Los resultados del estudio se resumirán en tablas en el informe final y deben incluir todos los aspectos enumerados en el punto 24.

Evaluación de los resultados

22. Deben evaluarse las puntuaciones de la irritación cutánea, junto con la naturaleza y la gravedad de las lesiones, así como su reversibilidad o irreversibilidad. Las puntuaciones individuales no constituyen una medida absoluta de las propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material problema. En cambio, las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que han de evaluarse en combinación con todas las demás observaciones del estudio.
23. Para evaluar las respuestas irritativas hay que tener en cuenta la reversibilidad de las lesiones cutáneas. Si se producen respuestas como alopecia (zona limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación, y persisten al final del período de observación de 14 días, se considerará que el producto problema es un irritante.

Informe del ensayo

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

Justificación del ensayo in vivo:

- Análisis de ponderación de las pruebas correspondientes a los datos de ensayos anteriores, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial;
- Descripción de datos relevantes disponibles de ensayos realizados anteriormente;
- Datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación;

- Descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos y los resultados obtenidos con las sustancias analizadas / de referencia;
- Análisis de ponderación de las pruebas para realizar el estudio *in vivo*.

Producto problema:

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;
- Sustancias de componentes múltiples, mezclas y sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos (UVCB): deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el guion anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- Origen; número de lote, si está disponible;
- Tratamiento del producto problema / sustancia de control antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;
- Condiciones de conservación.

Vehículo:

- Identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;
- Motivación de la elección del vehículo.

Animales de ensayo:

- Especie/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos;
- Número de animales de cada sexo;
- Peso de cada animal al principio y al final del ensayo;
- Edad al inicio del estudio;
- Origen de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

- Técnica de preparación del lugar de la aplicación del parche;
- Datos de los materiales del parche y técnica de la aplicación;

- Detalles de la preparación, aplicación y retirada del producto problema.

Resultados:

- Tabulación de las puntuaciones de las respuestas de irritación/corrosión de cada animal en todos los puntos temporales medidos;
- Descripciones de todas las lesiones observadas;
- Descripción narrativa de la naturaleza y grado de irritación o de corrosión observado, y eventuales observaciones histopatológicas;
- Descripción de otros efectos adversos locales (por ejemplo, destrucción de la grasa de la piel) y sistémicos, además de la irritación o corrosión cutánea.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) OCDE (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Noviembre de 1998.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, París.

CUADRO: CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES CUTÁNEAS**Eritema y formación de escaras**

Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (enrojecimiento de color carne) o formación de escaras que impide clasificar el eritema ...	4
Máximo posible: 4	

Formación de edema

Sin edema	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema leve (bordes de la zona bien definidos por una elevación clara)	2
Edema moderado (elevación de 1 mm aproximadamente)	3
Edema intenso (se eleva más de 1 mm y se extiende más allá de la zona de exposición) ...	4
Máximo posible: 4	

Puede realizarse un examen histopatológico para aclarar respuestas dudosas.

Apéndice

DEFINICIONES

Producto: Sustancia o mezcla.

Irritación cutánea: Producción de una lesión reversible de la piel tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas.

Corrosión cutánea: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y en la dermis, tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.».

2) En la parte B, el capítulo B.17 se sustituye por el texto siguiente:

«B.17. ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO LOS GENES HPRT Y XPRT

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 476 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y el bienestar animal. La presente versión actualizada del método de ensayo B.17 refleja casi treinta años de experiencia con este ensayo y también es resultado del desarrollo de un nuevo método aparte dedicado a los ensayos de mutación génica de células de mamífero *in vitro* utilizando el gen de la timidina-cinasa. El método B.17 forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).
2. El objetivo del ensayo de mutación génica de células de mamífero es detectar las mutaciones génicas inducidas por los productos. Las líneas celulares utilizadas en estos ensayos miden las mutaciones directas de genes marcadores, en concreto el gen endógeno de la hipoxantina-guanina-fosfo-ribosil-transferasa (Hprt en células de roedor, HPRT en células humanas; denominado colectivamente gen Hprt y ensayo HPRT en el presente método de ensayo) y el transgén de la xantina-guanina-fosfo-ribosil-transferasa (gpt) (denominado ensayo XPRT). Los ensayos de mutación HPRT y XPRT detectan diversos espectros de fenómenos genéticos. Además de los fenómenos mutacionales detectados por el ensayo HPRT (p. ej., sustituciones de pares de bases, desplazamientos del marco de lectura, pequeñas supresiones e inserciones), la localización autosómica del transgén gpt puede permitir la detección de mutaciones resultantes de grandes supresiones y recombinaciones posiblemente mitóticas no detectadas por el ensayo HPRT porque el gen Hprt se encuentra en el cromosoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). El ensayo XPRT se utiliza actualmente con menor frecuencia que el ensayo HPRT con fines normativos.
3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. Los ensayos efectuados *in vitro* requieren generalmente el uso de una fuente exógena de activación metabólica. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*.
5. Hay que procurar evitar las condiciones que lleven a la producción de resultados positivos que sean artefactos (es decir, debidos a la posible interacción con el sistema de ensayo), no

causados por la interacción directa entre los productos problema y el material genético de la célula; pueden mencionarse entre tales condiciones los cambios de pH o de osmolalidad (8) (9) (10), la interacción con los componentes del medio (11) (12), o unos niveles excesivos de citotoxicidad (13). Se considera excesiva para el ensayo HPRT la citotoxicidad que supere los niveles máximos recomendados de citotoxicidad que se definen en el punto 19.

6. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Las células mutantes deficientes en actividad de la enzima Hprt en el ensayo HPRT o de la enzima xprt en el ensayo XPRT son resistentes a los efectos citostáticos de la 6-tioguanina (TG), análogo de la purina. Las células capaces de producir Hprt (en el ensayo HPRT) o gpt (en el ensayo XPRT) son sensibles a la TG, que provoca la inhibición del metabolismo celular y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TG, mientras que no lo son las células normales, que contienen la enzima Hprt (en el ensayo HPRT) o gpt (en el ensayo XPRT).
8. Se exponen al producto problema células en suspensión o en cultivos monocapa, tanto en presencia como en ausencia de una fuente exógena de activación metabólica (véase el punto 14), durante un plazo adecuado (3-6 horas), y después se subcultivan para determinar la citotoxicidad y permitir la expresión fenotípica antes de la selección de los mutantes (14) (15) (16) (17). La citotoxicidad se determina mediante la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación medida inmediatamente después del tratamiento y ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento respecto al testigo negativo (punto 18 y apéndice 2). Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un plazo suficiente, específico para cada tipo celular, de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima (normalmente un mínimo de 7-9 días). Tras la expresión fenotípica, la frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con el agente selectivo para detectar las colonias de mutantes, y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficiencia de clonación (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. La frecuencia de mutantes se calcula en función del número de colonias de mutantes, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación, en el momento de la selección de los mutantes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparaciones

Células

9. Las células utilizadas en los ensayos HPRT y XPRT deben haber demostrado su sensibilidad a los mutágenos químicos, una elevada eficiencia de clonación, un cariotipo estable, y una frecuencia estable de mutantes espontáneos. Entre las células utilizadas con mayor frecuencia para el ensayo HPRT se incluyen las líneas CHO, CHL y V79 de hámster chino, las células de linfoma de ratón L5178Y, y las células linfoblastoides humanas TK6 (18) (19). Para el ensayo XPRT se utilizan células AS52 derivadas de CHO con el transgén gpt (y de las que se ha suprimido el gen Hprt) (20) (21); el ensayo HPRT no puede realizarse con células AS52 porque en ellas se ha suprimido el gen Hprt. Debe justificarse y validarse el eventual uso de otras líneas celulares.
10. Las líneas celulares deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* (22) (23), y no deben utilizarse las células que estén contaminadas o que presenten un cambio en el número modal de cromosomas. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal utilizada en el laboratorio de ensayo, la cual debe ser coherente con las características celulares publicadas. También ha de comprobarse la frecuencia de mutantes espontáneos en el cultivo celular madre, y este no debe utilizarse si la frecuencia de mutantes no es aceptable.
11. Antes de emplear un cultivo en este ensayo, es necesario limpiarlo de células mutantes preexistentes, p. ej. cultivándolo en medio HAT en caso de ensayo HPRT y en MPA en caso de ensayo XPRT (5) (24) (véase el apéndice 1). Las células limpiadas pueden criopreservarse y después descongelarse para utilizarse como cultivos de trabajo. Los cultivos de trabajo recién descongelados pueden utilizarse para el ensayo después de que se consigan tiempos normales de duplicación. Al efectuar el ensayo XPRT, el cultivo sistemático de las células AS52 debe hacerse en unas condiciones que garanticen el mantenimiento del transgén gpt (20).

Medios y condiciones de cultivo

12. Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, y temperatura de incubación de 37 °C). Los cultivos celulares deben mantenerse siempre en condiciones que garanticen que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Es especialmente importante elegir medios y condiciones de cultivo que garanticen un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y una eficiencia de clonación óptima de las células, tanto mutantes como no mutantes.

Preparación de los cultivos

13. Las líneas celulares se propagan a partir de cultivos madre, y se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que las células en suspensión o en monocapas sigan creciendo exponencialmente a lo largo del tratamiento y del período de expresión (p. ej., debe evitarse la confluencia de las células que crecen en monocapas).

Activación metabólica

14. Se debe recurrir a sistemas exógenos de metabolización cuando se utilicen células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo en casos justificados, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) o una combinación de fenobarbital y β -naftoflavona (29) (30) (31) (32). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (33), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (29) (31). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 % (v/v), pero pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de las sustancias que se someten al ensayo (34) (35) (36).

Preparación del producto problema

15. Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células (véase el punto 16). Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (37) (38). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

CONDICIONES DE ENSAYO

Disolventes

16. El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad de los productos problema sin tener un impacto negativo en la realización del ensayo, por ejemplo por cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son ejemplos de disolventes bien establecidos el agua y el dimetilsulfóxido. En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v) y los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben superar el 10 % (v/v) en el

medio de tratamiento final. Si los disolventes utilizados no están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y los productos problema, así como su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante añadir testigos sin tratar (véase el apéndice 1) para demostrar que el disolvente elegido no es nocivo ni induce efectos mutagénicos.

Medición de la citotoxicidad y selección de las concentraciones de exposición

17. Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas que sean artefactos, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 20), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 21), o cambios marcados del pH o de la osmolalidad (véase el punto 5). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos que sean artefactos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.
18. La selección de las concentraciones se basa en la citotoxicidad y en otras consideraciones (véanse los puntos 20-22). Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar ese ensayo inicial. Incluso aunque se realice una evaluación inicial de la citotoxicidad, sigue siendo necesario medir la citotoxicidad en cada cultivo del experimento principal. La citotoxicidad debe evaluarse utilizando la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta las eventuales pérdidas de células durante el tratamiento, sobre la base del recuento celular, frente a la eficiencia de clonación ajustada de los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase la fórmula en el apéndice 2).
19. Deben evaluarse al menos cuatro concentraciones de ensayo (sin incluir los testigos positivos y de disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Si bien es aconsejable utilizar cultivos duplicados, a cada concentración estudiada podrán utilizarse cultivos tratados bien replicados o bien únicos. Los resultados obtenidos en los cultivos replicados independientes a una concentración determinada deben comunicarse por separado, pero pueden agruparse para el análisis de datos (17). En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Si se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben abarcar una gama de concentraciones desde la que produce citotoxicidad hasta aquellas a las que la citotoxicidad es moderada y pequeña o nula. Muchos productos problema presentan curvas concentración-respuesta de elevada

pendiente y, a fin de abarcar todo el intervalo de citotoxicidad o de estudiar la relación concentración-respuesta en detalle, puede ser necesario utilizar concentraciones más próximas entre sí y en un número superior a cuatro, en particular en situaciones en las que se requiera repetir un experimento (véase el punto 43). La utilización de más de cuatro concentraciones puede ser especialmente importante si se utilizan cultivos únicos.

20. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe intentar conseguir una supervivencia relativa de entre el 20 y el 10 %. Hay que tener cuidado al interpretar los resultados positivos que solo se encuentren con una supervivencia relativa inferior o igual al 10 % (punto 43).
21. Con productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima de la concentración mínima insoluble, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos que sean artefactos. A la concentración a la que se produzca un precipitado, hay que tener cuidado para que el precipitado no interfiera con la realización del ensayo. Puede ser útil determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de efectuar el experimento.
22. Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (39) (40). Cuando el producto problema no tenga una composición definida y se trate, p. ej., de una sustancia de composición desconocida o variable, de productos complejos de reacción o de materiales biológicos [es decir, sustancias de composición desconocida o variable (UVCB)] (41), extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (p. ej., 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (42).

Testigos

23. Se incluirán, para cada condición experimental, testigos negativos en paralelo (véase el punto 16), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y manipulados de la misma manera que los cultivos tratados.
24. Es necesario disponer de testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar mutágenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado y la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica, si procede. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otras sustancias, si se justifica. Dado que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados, es

posible realizar ensayos que utilicen tratamientos con y sin activación metabólica exógena empleando únicamente un testigo positivo que requiera activación metabólica. En este caso, una respuesta de este único testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la sensibilidad del sistema de ensayo. Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que se espera que den un aumento reproducible y detectable respecto al nivel de fondo, a fin de demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo, y la respuesta no debe ponerse en peligro por una citotoxicidad que supere los límites especificados en el presente método de ensayo (véase el punto 20).

Cuadro 1: Sustancias de referencia recomendadas para evaluar la competencia del laboratorio y para la selección de los testigos positivos.

Activación metabólica	Locus	Sustancia y n.º CAS
Ausencia de activación metabólica exógena	<i>Hprt</i>	Metanosulfonato de etilo [n.º CAS 62-50-0] Etilnitrosourea [n.º CAS 759-73-9] 1-óxido de 4-nitroquinolina [n.º CAS 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Estreptonigrina [n.º CAS 3930-19-6] Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7]
Presencia de activación metabólica exógena	<i>Hprt</i>	3-Metilcolantreno [n.º CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantraceno [n.º CAS 57-97-6] Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]

PROCEDIMIENTO

Tratamiento con el producto problema

25. Se tratan células en crecimiento con el producto problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La exposición debe durar un plazo de tiempo adecuado (generalmente de 3 a 6 horas).
26. El número mínimo de células utilizadas para cada cultivo de ensayo (testigo y tratado) en cada fase del ensayo debe basarse en la frecuencia de mutantes espontáneos. Como guía general, hay que tratar y cultivar células suficientes como para mantener 10 mutantes espontáneos en cada cultivo en todas las fases del ensayo (17). La frecuencia de mutantes espontáneos suele estar entre 5 y 20×10^{-6} . Con una frecuencia de mutantes espontáneos de 5×10^{-6} y para mantener un número suficiente de mutantes espontáneos (10 o más), incluso en el caso de los cultivos tratados a concentraciones que den lugar a una citotoxicidad del 90 % durante el tratamiento (10 % supervivencia relativa), sería necesario tratar al menos 20×10^6 células. Además, debe cultivarse durante el período de expresión un número suficiente de células (pero nunca menos de 2×10^6), y sembrarse para la selección de mutantes (17).

Período de expresión fenotípica y medición de la frecuencia de mutantes

27. Tras el período de tratamiento, las células se cultivan para que se pueda expresar el fenotipo mutante. Un mínimo de 7 a 9 días es, en general, suficiente para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes Hprt y xprt recién inducidos (43) (44). Durante este período, las células se subcultivan periódicamente para mantenerlas en crecimiento exponencial. Después de la expresión fenotípica, las células se vuelven a sembrar en medio con y sin agente selectivo (6-tioguanina) para determinar el número de mutantes y la eficiencia de clonación en el momento de la selección, respectivamente. Esta siembra se puede llevar a cabo utilizando placas Petri para cultivos monocapa o placas de micropocillos para células en suspensión. Para la selección de mutantes, las células deben sembrarse a una densidad que garantice la recuperación óptima de los mutantes (es decir, evitar la cooperación metabólica) (17). Las placas se incuban durante el tiempo adecuado para lograr un crecimiento óptimo de las colonias (por ejemplo, 7-12 días) y después se cuentan estas. La frecuencia de mutantes se calcula a partir del número de colonias mutantes corregido según la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes (véanse las fórmulas en el apéndice 2).

Competencia del laboratorio

28. Con el fin de conseguir la suficiente experiencia con el ensayo antes de su uso para los ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con sustancias positivas de referencia que actúen a través de mecanismos diferentes (como mínimo, una activa con activación metabólica y otra activa sin ella, seleccionadas de entre las sustancias enumeradas en el cuadro 1) y con diversos testigos negativos (utilizando diferentes disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Esto no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 30 a 33.
29. Debe investigarse una selección de sustancias testigo positivo (véase el cuadro 1 del punto 25) en ausencia y en presencia de activación metabólica, para demostrar su capacidad de detectar productos mutágenos, para determinar la efectividad del sistema de activación metabólica y para demostrar la adecuación de las condiciones de crecimiento celular durante el tratamiento, la expresión fenotípica y la selección de mutantes, así como la adecuación de los procedimientos de examen. La gama de concentraciones de las sustancias seleccionadas debe elegirse de forma que produzcan aumentos sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles, para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

Datos sobre testigos históricos

30. El laboratorio debe determinar:

- un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,
 - un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.
31. Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con una distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos (22). Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (17) (45) (46).
 32. La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (47)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio (46). En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (45).
 33. Los datos de los testigos negativos deben consistir en frecuencias de mutantes procedentes de cultivos únicos o preferiblemente replicados, tal como se describe en el punto 23. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (17) (45) (46). Cuando hay datos de los testigos negativos en paralelo que quedan fuera del límite de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores atípicos extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase más arriba) y pruebas de la ausencia de fallos técnicos o humanos.
 34. Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su coherencia con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

DATOS E INFORME

Presentación de los resultados

35. La presentación de los resultados debe incluir todos los datos necesarios para calcular la citotoxicidad (expresada como supervivencia relativa). Los datos, tanto los relativos a los cultivos tratados como a los testigos, deben incluir el número de células al final del tratamiento, el número de células sembradas inmediatamente después del tratamiento y los

recuentos de colonias (o el número de pocillos sin colonias en el método de micropocillos). La supervivencia relativa de cada cultivo debe expresarse como porcentaje en relación con el control del disolvente en paralelo (véanse las definiciones del apéndice 1).

36. La presentación de los resultados debe incluir también todos los datos necesarios para calcular la frecuencia de mutantes. Los datos, tanto de los cultivos tratados como de los cultivos testigo, deben incluir: 1) el número de células sembradas con y sin agente selectivo (en el momento en que las células se siembran para la selección de mutantes), y 2) el número de colonias contadas (o el número de pocillos sin colonias en el método de micropocillos) en las placas con y sin agente selectivo. La frecuencia de mutantes se calcula a partir del número de colonias mutantes (en las placas con agente selectivo) corregido según la eficiencia de clonación (de las placas sin agente selectivo). La frecuencia de mutantes debe expresarse como número de células mutantes por millón de células viables (véanse las definiciones del apéndice 1).
37. Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

Criterios de aceptabilidad

38. La aceptabilidad de un ensayo se basa en los criterios siguientes:

- El testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en el punto 33.
- Los testigos positivos en paralelo (véase el punto 24) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.
- Se someten a ensayo dos condiciones experimentales (es decir, con y sin activación metabólica), salvo cuando ya en una se produce un resultado positivo (véase el punto 25).
- Son analizables números y concentraciones apropiados de células (puntos 25, 26 y 19).
- Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritos en los puntos 20, 21 y 22.

Evaluación e interpretación de los resultados

39. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas:
 - al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

- el aumento está relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,
- alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 33).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir mutaciones génicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (46) (48).

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas, también se cumple lo siguiente:

- ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,
- no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,
- todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 33).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones génicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo.

41. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.

42. En los casos en que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil repetir un experimento, quizá con alguna modificación de las condiciones experimentales [por ejemplo, separación entre las concentraciones, otras condiciones de activación metabólica (es decir, concentración u origen de la fracción S9)].

43. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos no permite que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo. Por lo tanto, debe concluirse que la respuesta del producto problema es dudosa (lo que se interpreta como que resulta igualmente probable que sea positiva o negativa).

Informe del ensayo

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

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;
- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Disolvente:

- justificación de la elección del disolvente;
- porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

Células:

En el caso de cultivos madre de laboratorio:

- tipo, fuente de las líneas celulares;
- número de pases, si se conoce, e historial en el laboratorio;
- características del cariotipo y/o número modal de los cromosomas;
- métodos de mantenimiento de los cultivos celulares;
- ausencia de micoplasmas;
- tiempos de duplicación de las células.

Condiciones del ensayo:

- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos con inclusión, p. ej., de datos relativos a la citotoxicidad y límites de solubilidad;
- composición de los medios, concentración de CO₂, nivel de humedad;

- concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, mM, o μg o mg/ml de medio de cultivo);
- concentración (o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;
- temperatura de incubación;
- tiempo de incubación;
- duración del tratamiento;
- densidad celular durante el tratamiento;
- tipo y composición del sistema de activación metabólica (origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de mezcla S9 y de fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9);
- sustancias testigo positivo y negativo, concentraciones finales en cada una de las condiciones de tratamiento;
- duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede);
- identidad del agente selectivo y su concentración;
- criterios de aceptabilidad de los ensayos;
- métodos empleados para contar las células viables y las mutantes;
- métodos utilizados para medir la citotoxicidad;
- cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;
- duración de la incubación después de la siembra;
- criterios empleados para considerar si los estudios son positivos, negativos o dudosos;
- métodos utilizados para determinar el pH, la osmolalidad y la precipitación.

Resultados:

- número de células tratadas y número de células subcultivadas por cada cultivo;
- mediciones de la citotoxicidad y otras observaciones, en su caso;
- signos de precipitación y momento de la determinación;
- número de células sembradas en medio selectivo y no selectivo;
- número de colonias en medio no selectivo y número de colonias resistentes en medio selectivo, y frecuencias de mutantes correspondientes;
- relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

- datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;
- datos históricos de los testigos negativos (disolvente) y positivos, con intervalos, medias y desviaciones típicas e intervalo de confianza (p. ej., 95 %), así como número de datos;
- análisis estadísticos (correspondientes a los cultivos individuales y a las réplicas combinadas, en su caso), y valores p, en su caso.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, París.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Nueva York.
- (3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584 1–256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.

- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (33) PNUMA (2001). Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cy Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Microbiol. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Microbiol. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.

- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- (46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Mutágenos por sustitución de pares de bases: Productos que provocan la sustitución de pares de bases en el ADN.

Producto: Sustancia o mezcla.

Eficiencia de clonación: Porcentaje de células sembradas a baja densidad que pueden crecer para formar una colonia que puede contarse.

Concentraciones: Concentraciones finales del producto problema en el medio de cultivo.

Citotoxicidad: En relación con los ensayos incluidos en este método de ensayo, la citotoxicidad se identifica como una reducción en la supervivencia relativa de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véase el punto específico).

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

Mutágenos por desplazamiento del marco de lectura: Productos que provocan la adición o supresión de uno o varios pares de bases en la molécula de ADN.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o del cromosoma, con inclusión de roturas de ADN, aductos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

Medio HAT: Medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, utilizado para la limpieza de mutantes Hp^rt.

Recombinación mitótica: Durante la mitosis, recombinación entre cromátidas homólogas que puede dar lugar a la inducción de roturas de la doble cadena de ADN, o a una pérdida de heterocigosis.

Medio MPA: Medio que contiene xantina, adenina, tiamidina, aminopterina y ácido micofenólico, utilizado para la limpieza de mutantes Xp^rt.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

Frecuencia de mutantes: Número de colonias mutantes dividido por el número de células sembradas en medio selectivo, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación (o viabilidad) en el momento de la selección.

Período de expresión fenotípica: Tiempo después del tratamiento en el que la alteración genética se fija en el genoma y los eventuales productos génicos preexistentes se agotan hasta que se modifica el rasgo fenotípico.

Supervivencia relativa: Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento. La supervivencia relativa es la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %).

Fracciones hepáticas S9: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9 000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

Mezcla S9: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

Control del disolvente: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Testigo sin tratar: Cultivo que no recibe tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se somete en paralelo al mismo proceso que los cultivos que reciben el producto problema.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

Apéndice 2

FÓRMULAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y LA FRECUENCIA DE MUTANTES

La citotoxicidad se evalúa mediante la supervivencia relativa (SR), es decir, la eficiencia de clonación (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación ajustada en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase más abajo la fórmula de la SR).

La EC ajustada correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$\text{EC ajustada} = \frac{\text{Número de células al final del tratamiento}}{\text{Número de células al inicio del tratamiento}}$$

La SR correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$\text{SR} = \frac{\text{EC ajustada en el cultivo tratado}}{\text{EC ajustada en el control del disolvente}} \times 100$$

La frecuencia de mutantes es la eficiencia de clonación de las colonias mutantes en el medio selectivo dividida por la eficiencia de clonación en el medio no selectivo en relación con el mismo cultivo en el momento de la selección.

$$\text{Frecuencia de mutantes} = \frac{\text{Eficiencia de clonación de colonias mutantes en medio selectivo}}{\text{Eficiencia de clonación en medio no selectivo}}$$

Cuando se utilizan placas para determinar la eficiencia de clonación:

$$\text{EC} = \text{Número de colonias} / \text{Número de células sembradas.}$$

Cuando se utilizan placas de micropocillos para determinar la eficiencia de clonación:

El número de colonias por pocillo en las placas de micropocillos sigue una distribución de Poisson.

$$\text{Eficiencia de clonación} = -\ln P(0) / \text{Número de células sembradas por pocillo}$$

donde $-\ln P(0)$ es el número probable de pocillos vacíos de entre los pocillos sembrados y se describe mediante la fórmula siguiente:

$\ln P(0) = -\ln (\text{número de pocillos vacíos} / \text{número de pocillos sembrados})$ ».

3) En la parte B, el capítulo B.22 se sustituye por el texto siguiente:

«B.22 ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 478 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones relativas al bienestar animal. Esta versión modificada del método de ensayo refleja más de treinta años de experiencia con este ensayo y la posibilidad de integrarlo o combinarlo con otros ensayos de toxicidad, tales como estudios de desarrollo, toxicidad para la reproducción o genotoxicidad; sin embargo, debido a sus limitaciones y al uso de un gran número de animales, este ensayo no se destina a utilizarse como método primario, sino más bien como método de ensayo complementario que solo puede utilizarse cuando no existen alternativas para cumplir los requisitos normativos. La combinación de ensayos de toxicidad ofrece la posibilidad de no tener que utilizar un gran número de animales en tales ensayos. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).
2. El objetivo del ensayo de letalidad dominante (LD) es investigar si los productos provocan mutaciones derivadas de aberraciones cromosómicas en células germinales. Además, el ensayo de letalidad dominante es pertinente para evaluar la genotoxicidad porque, aunque pueden variar entre las especies, los factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN están activos y contribuyen a la respuesta. La inducción de una mutación LD después de la exposición a un producto problema indica que este ha afectado al tejido germinal del animal de ensayo.
3. Las mutaciones LD provocan la muerte del embrión o del feto. La inducción de mutaciones LD tras la exposición a un producto problema indica que este ha afectado a las células germinales del animal de ensayo.
4. Un ensayo LD es útil para confirmar los resultados positivos de los ensayos utilizando criterios de valoración somáticos *in vivo*, y constituye un criterio pertinente para la predicción del peligro para el hombre y del riesgo de enfermedades genéticas transmitidas a través de la estirpe germinal. Sin embargo, este ensayo requiere un gran número de animales y mucho trabajo; como consecuencia de ello, su realización es muy cara y lenta. Puesto que la frecuencia espontánea de mutaciones letales dominantes es bastante elevada, es generalmente limitada la sensibilidad del ensayo para la detección de pequeños aumentos en la frecuencia de mutaciones.

5. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice 1.

CONSIDERACIONES INICIALES

6. La prueba se lleva a cabo con mayor frecuencia con ratones (2) (3) (4), pero en algunos casos puede ser adecuado realizarla con otras especies, como las ratas (5) (6) (7) (8), si está científicamente justificado. En términos generales, las mutaciones LD consisten en grandes aberraciones cromosómicas (anomalías estructurales y numéricas) (9) (10) (11), pero no pueden excluirse las mutaciones génicas. Una mutación LD es una mutación que se produce en una célula germinal de por sí, o se fija en el embrión incipiente después de la fertilización, que no provoca disfunciones en el gameto, pero que es letal para el óvulo fecundado o el embrión en desarrollo.
7. Los distintos machos se aparean secuencialmente con hembras vírgenes a intervalos apropiados. El número de apareamientos después del tratamiento depende del propósito final del estudio LD (punto 23) y debe garantizar que se evalúen en cuanto a las mutaciones LD todas las fases de maduración de las células germinales de los machos (12).
8. No procede utilizar este ensayo si hay pruebas de que el producto problema, o sus metabolitos, no llegan a los testículos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

9. Generalmente, los machos se exponen a un producto problema por una vía de exposición adecuada y se aparean con hembras vírgenes no tratadas. Pueden someterse a ensayo diferentes tipos de células germinales mediante la utilización de intervalos de apareamiento secuenciales. Tras el apareamiento, las hembras se sacrifican al cabo de un período de tiempo adecuado, y se examinan sus úteros para determinar el número de implantes y de embriones vivos y muertos. La letalidad dominante de un producto problema se determina comparando el número de implantes vivos por hembra del grupo tratado con el número de implantes vivos por hembra del grupo de control del vehículo/disolvente. El aumento del número de implantes muertos por hembra del grupo tratado respecto al número de implantes muertos por hembra del grupo testigo refleja las pérdidas tras la implantación inducidas por el producto problema. Las pérdidas tras la implantación se calculan comparando la relación entre implantes muertos e implantes totales en el grupo tratado, con la relación entre implantes muertos e implantes totales en el grupo testigo. Las pérdidas previas a la implantación pueden calcularse comparando el número de cuerpos lúteos menos el de implantes totales o el número de implantes totales por hembra en los grupos tratado y testigo.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

10. La competencia en este ensayo debe establecerse demostrando la capacidad de reproducir las frecuencias de mutaciones letales dominantes obtenidas de datos publicados [p. ej., (13) (14) (15) (16) (17) (18)] con sustancias testigo positivo (incluidas respuestas débiles) como las que figuran en el cuadro 1, y con controles de vehículo, y obteniendo con los testigos negativos unas frecuencias concordantes con un intervalo aceptable de datos (véanse las referencias anteriores) o con la distribución histórica de testigos del laboratorio, si se dispone de ella.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparaciones

Selección de la especie animal

11. Deben emplearse animales sexualmente maduros, sanos, de cepas de laboratorio de uso corriente. Se utilizan habitualmente ratones, pero también puede ser adecuado recurrir a las ratas. Puede utilizarse cualquier otra especie apropiada de mamíferos, si se facilita la justificación científica en el informe.

Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales

12. En el caso de los roedores, la temperatura en el local de los animales debe ser de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe ser idealmente del 50-60 %, como mínimo del 40 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Antes de proceder al tratamiento o al apareamiento, hay que alojar a los roedores en pequeños grupos (no más de cinco animales) del mismo sexo si no se esperan ni se observan comportamientos agresivos, preferiblemente en jaulas sólidas con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales pueden alojarse individualmente si está científicamente justificado.

Preparación de los animales

13. Los animales adultos, sanos y sexualmente maduros, tanto machos como hembras, se reparten al azar entre los grupos tratado y testigo. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada con el testigo positivo y el producto problema. La variación del

peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder del $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

Preparación de las dosis

14. Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En caso de exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, vapor o aerosol sólido/líquido, dependiendo de sus propiedades físicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

Condiciones de ensayo

Disolvente o vehículo

15. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a los volúmenes de dosis empleados, y no ha de sospecharse que reaccione químicamente con el producto problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos comúnmente utilizados de disolventes o vehículos compatibles el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz.

Testigos positivos

16. Deben utilizarse siempre animales testigo positivo en paralelo, a menos que el laboratorio haya demostrado su competencia en la realización del ensayo y haya utilizado el ensayo de forma sistemática en los últimos años (por ejemplo, en los últimos 5 años). Sin embargo, no es necesario tratar a los animales testigo positivo por la misma vía que a los animales que reciben el producto problema, ni tomar muestras a todos los intervalos de apareamiento. De las sustancias testigo positivo debe saberse que producen letalidad dominante en las condiciones utilizadas en el ensayo. Excepto en lo relativo al tratamiento, los animales de los grupos testigo deben someterse al mismo procedimiento que los de los grupos tratados.
17. Las dosis de las sustancias testigo positivo deben seleccionarse de manera que se produzcan efectos débiles o moderados que sirvan para evaluar críticamente el comportamiento y la sensibilidad del ensayo, pero también de manera que se produzcan sistemáticamente efectos positivos de mortalidad dominante. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias testigo positivo y dosis apropiadas.

Cuadro 1: Ejemplos de sustancias testigo positivo.

Sustancia [n.º CAS] (n.º de referencia)	Intervalo efectivo de dosis (mg/kg) (especie de roedores)	Tiempo de administración (días)
Trietilenomelamina [51-18-3] (15)	0,25 (ratones)	1
Ciclofosfamida [50-18-0] (19)	50-150 (ratones)	5
Ciclofosfamida [50-18-0] (5)	25-100 (ratas)	1
Metanosulfonato de etilo [62-50-0] (13)	100-300 (ratones)	5
Acrilamida monomérica [79-06-1] (17)	50 (ratones)	5
Clorambucilo [305-03-3] (14)	25 (ratones)	1

Testigos negativos

18. Respecto a cada tiempo de muestreo deben incluirse animales testigo negativo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, y sometidos en lo demás a lo mismo que los grupos de tratamiento (20). Si no se tienen datos de testigos, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ninguna mutación letal dominante ni otros efectos nocivos, deben incluirse también para cada momento de muestreo animales testigo sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número de animales

19. Cada macho se aparea secuencialmente a intervalos adecuados predeterminados (por ejemplo, intervalos semanales, puntos 21 y 23) de preferencia con una sola hembra virgen. El número de machos por grupo debe establecerse de antemano para que sea suficiente (en combinación con el número de hembras apareadas a cada intervalo de apareamiento) a fin de proporcionar la potencia estadística necesaria para detectar al menos una duplicación de la frecuencia de mutaciones LD (punto 44).
20. El número de hembras por intervalo de apareamiento también debe determinarse mediante cálculos de la potencia estadística para permitir la detección de al menos una duplicación en la frecuencia de mutaciones LD (es decir, una cantidad suficiente de hembras gestantes para proporcionar al menos 400 implantes totales) (20) (21) (22) (23) y que se prevea al menos un implante muerto por unidad de análisis (es decir, grupo de apareamiento por dosis) (24).

Intervalos entre períodos de administración y apareamientos

21. El número de intervalos de apareamiento tras el tratamiento se rige por el programa de tratamiento, y debe garantizar que todas las fases de maduración de las células germinales de los machos se evalúan en cuanto a la inducción de mutaciones LD (12) (25). En caso de un único tratamiento y hasta cinco administraciones diarias de dosis, debe haber 8 (con ratones) o 10 (con ratas) apareamientos efectuados a intervalos semanales tras el último tratamiento. En caso de administraciones de dosis múltiples, el número de intervalos de apareamiento puede reducirse proporcionalmente al aumento del tiempo del período de administración, pero manteniendo el objetivo de evaluar todas las fases de la espermatogénesis (p. ej., tras una exposición de 28 días, solo 4 apareamientos semanales son suficientes para evaluar todas las fases de la espermatogénesis en el ratón). Todos los programas de tratamiento y apareamiento deben justificarse científicamente.
22. Las hembras deben permanecer con los machos durante al menos un ciclo estral (p. ej., una semana cubre un ciclo estral tanto en ratones como en ratas). Las hembras que no se hayan apareado durante el intervalo de una semana pueden utilizarse para un intervalo de apareamiento posterior. Otra posibilidad es hasta que se haya producido el apareamiento, determinado por la presencia de espermatozoides en la vagina o por la presencia de un tapón vaginal.
23. El régimen seguido de exposición y apareamiento depende del objetivo final del estudio de LD. Si se trata de determinar si un producto químico dado induce *per se* mutaciones LD, el método aceptado sería exponer toda una ronda de espermatogénesis (p. ej., 7 semanas en el ratón, 5-7 tratamientos por semana) y aparear una vez al final. Sin embargo, si se trata de identificar el tipo de células germinales sensibles a la inducción de mutaciones LD, es preferible una exposición única o de 5 días seguida de apareamiento semanal.

Dosis

24. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo de dosis porque no se dispone aún de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y régimen de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal (26). El estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), es decir, la dosis más alta que se tolera sin signos de toxicidad que limite el estudio, en relación con la duración del período de estudio (por ejemplo, comportamiento o reacciones anormales, reducción del peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético), pero sin llegar a la muerte ni presentar signos de dolor, sufrimiento o angustia que requieran el sacrificio compasivo (27).
25. La DMT tampoco debe afectar negativamente al éxito del apareamiento (21).
26. Los productos que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y los productos que presentan saturación de las

propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones de los criterios de establecimiento de las dosis y deben evaluarse caso por caso.

27. A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en un estudio de determinación del intervalo o según los datos disponibles, la dosis más alta para una administración única debe ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. En el caso de productos no tóxicos, la dosis límite para un período de administración de 14 días o más es de 1 000 mg/kg de peso corporal/día y, si se trata de períodos de administración de menos de 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg peso corporal/día.

Administración de las dosis

28. A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, en casos justificados pueden elegirse vías de exposición tales como los alimentos, el agua de bebida, la subcutánea, la intravenosa, la tópica, la inhalación, la oral forzada o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido o tejidos diana. Normalmente no se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía de exposición humana prevista, y debe utilizarse solo en casos que tengan justificación científica específica. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el apareamiento sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véase el punto 31). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar normalmente 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g. Si se utilizan volúmenes superiores a estos (en caso de que lo permita la legislación sobre bienestar animal), debe justificarse. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración, para garantizar un volumen constante en relación con el peso corporal en todas las dosis.

Observaciones

29. Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día durante el periodo de administración, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los

animales al principio del estudio, y al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada, y en el momento del sacrificio. El consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie esta y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (27).

Recogida y preparación de los tejidos

30. Las hembras son sacrificadas en la segunda mitad de la gestación, el día 13 de esta en el caso de los ratones y el día 14-15 en el caso de las ratas. Se examinan los úteros con respecto a los efectos letales dominantes para determinar el número de implantes, embriones vivos y muertos, y cuerpos amarillos.
31. Se exponen las trompas uterinas y los ovarios para efectuar el recuento de cuerpos amarillos, y los fetos se retiran, se cuentan y se pesan. Hay que tener cuidado en examinar los úteros en cuanto a la presencia de reabsorciones oscurecidas por fetos vivos y en asegurarse de que se tienen en cuenta todas las reabsorciones. Se registra la mortalidad fetal. Se registran también el número de hembras fecundadas con éxito y el número total de implantes, las pérdidas previas a la implantación y la mortalidad tras la implantación (incluidas las reabsorciones precoces y tardías). Además, los fetos visibles pueden conservarse en el fijador de Bouin durante al menos 2 semanas, y después someterse a examen para detectar las principales malformaciones externas (28), con el fin de proporcionar información adicional en cuanto a los efectos del agente problema sobre la reproducción y sobre el desarrollo.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

32. Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de machos apareados, el de hembras gestantes y el de hembras no gestantes. Se facilitarán por separado los resultados de cada apareamiento, incluida la identidad de cada macho y hembra. Deben enumerarse respecto a cada hembra el intervalo de apareamiento, la dosis recibida por los machos tratados y el número de implantes vivos y de implantes muertos.
33. Las pérdidas tras la implantación se calculan determinando la relación entre los implantes muertos y los implantes totales del grupo tratado en comparación con la relación entre los implantes muertos y los implantes totales del grupo de control del vehículo/disolvente.
34. Las pérdidas previas a la implantación se calculan como la diferencia entre el número de cuerpos amarillos y el número de implantes, o como una reducción del número medio de implantes por hembra en comparación con los apareamientos testigo. Cuando se calculen las pérdidas previas a la implantación, deberán indicarse.

35. El factor de letalidad dominante se calcula de la siguiente manera: (muertes tras la implantación / implantes totales por hembra) x 100.

36. Deben indicarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos (según el punto 29).

Criterios de aceptabilidad

37. Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad de un ensayo:

- El testigo negativo en paralelo es coherente con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos negativos, y con los datos de testigos históricos del laboratorio, si estos están disponibles (véanse los puntos 10 y 18).
- Los testigos positivos en paralelo inducen respuestas coherentes con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos positivos, o con la base de datos de testigos históricos positivos del laboratorio, si están disponibles, y producen un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo (véanse los puntos 17 y 18).
- Se han analizado números adecuados de implantes totales y dosis (punto 20).
- Los criterios para la selección de la dosis más elevada son coherentes con los descritos en los puntos 24 y 27.

Evaluación e interpretación de los resultados

38. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con el producto problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta.

39. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

- al menos una de las dosis de ensayo produce un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;
- el aumento está relacionado con la dosis en al menos una condición experimental (p. ej., un intervalo de apareamiento semanal) cuando se evalúa con un ensayo adecuado; y
- alguno de los resultados está fuera del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces capaz de inducir mutaciones letales dominantes en las células germinales de los animales de ensayo. Las recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados se describen en el punto 44; también pueden encontrarse en la bibliografía otros enfoques estadísticos recomendados (20) (21) (22) (24)

(29). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si:

- ninguna de las dosis de ensayo presenta un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;
- no hay ningún aumento relacionado con la dosis en ninguna de las condiciones experimentales; y
- todos los resultados están dentro del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones letales dominantes en las células germinales de los animales de ensayo.

41. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o claramente negativa.

42. Si la respuesta no es claramente negativa o positiva, y para ayudar a determinar la pertinencia biológica de un resultado (p. ej., un incremento débil o dudoso), los datos deben ser evaluados por expertos o mediante otras investigaciones utilizando los datos experimentales existentes, como la consideración de si el resultado positivo se encuentra fuera del intervalo aceptable de datos de los testigos negativos o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (30).

43. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.

44. Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal macho. Si bien es posible que los datos de recuento (p. ej., el número de implantes por hembra) se ajusten a una distribución de Poisson y/o las proporciones (p. ej., la proporción de implantes muertos) puedan tener una distribución binomial, es frecuente que estos datos estén sobredispersados (31). Por consiguiente, el análisis estadístico debe basarse en primer lugar en un ensayo de sobredispersión o de subdispersión utilizando pruebas de varianza como, por ejemplo, la prueba de varianza binomial de Cochran (32) o la prueba $C(\alpha)$ de Tarone de la sobredispersión binomial (31) (33). Si no se detecta desviación de la dispersión binomial, las tendencias en las proporciones entre las distintas dosis pueden comprobarse utilizando la prueba de tendencia de Cochran-Armitage (34) y las comparaciones de pares con el grupo testigo pueden probarse mediante la prueba exacta de Fisher (35). De la misma manera, si no se detecta desviación de la dispersión de

Poisson, pueden comprobarse las tendencias en los recuentos utilizando la regresión de Poisson (36) y las comparaciones de pares con el grupo testigo pueden comprobarse en el contexto del modelo de Poisson, utilizando contrastes de pares (36). Si se detecta una sobredispersión o una subdispersión, se recomienda utilizar métodos no paramétricos (23) (31). Entre estos se incluyen pruebas basadas en la posición, como la prueba de Jonckheere-Terpstra sobre la tendencia (37) y las pruebas de Mann-Whitney (38), sobre comparaciones de pares con el grupo de control del vehículo/disolvente, así como pruebas de permutación, remuestreo o *bootstrap* sobre tendencias y comparaciones de pares con el grupo testigo (31) (39).

45. Un ensayo LD positivo aporta la prueba de la genotoxicidad del producto problema para las células germinales del macho tratado de la especie sometida a ensayo.
46. Para la evaluación de la significación biológica de la respuesta puede servir de orientación considerar si los valores observados se encuentran dentro o fuera del intervalo de los testigos históricos (40).

Informe del ensayo

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

Resumen.

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;
- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Preparación del producto problema:

- justificación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;
- preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;
- determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales) si se realizan.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas y justificación de la elección;
- número, edad y sexo de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- método de identificación individual de los animales;
- en el caso de estudios a corto plazo: peso corporal individual de los machos al inicio y al final del ensayo; para estudios de duración superior a una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos. Deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

Condiciones del ensayo:

- datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);
- datos del estudio de determinación del intervalo de dosis;
- justificación de la selección de las dosis;
- datos de la preparación del producto problema;
- datos sobre la administración del producto problema;
- justificación de la elección de la vía de administración;
- métodos de determinación de la toxicidad para los animales, incluidos los eventuales análisis histopatológicos o hematológicos, y frecuencia con que se han medido los pesos corporales y se han realizado las observaciones de los animales;
- métodos de comprobación de que el producto problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;
- dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua;

- datos sobre el enriquecimiento ambiental de las jaulas;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;
- método de analgesia;
- método de sacrificio;
- procedimientos de aislamiento y conservación de los tejidos;
- origen y números de lote de todos los juegos y reactivos (si procede);
- métodos para el recuento de las mutaciones LD;
- programa de apareamiento;
- métodos utilizados para determinar que ha tenido lugar el apareamiento;
- momento del sacrificio;
- criterios de examen de los efectos LD, incluidos los cuerpos lúteos, los implantes, las reabsorciones y las pérdidas previas a la implantación, los implantes vivos y los implantes muertos.

Resultados:

- estado de los animales antes del ensayo y a lo largo de este, incluidos los signos de toxicidad;
- peso corporal de los machos durante el tratamiento y los períodos de apareamiento;
- número de hembras apareadas;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- datos sobre los testigos negativos en paralelo e históricos, con intervalos, medias y desviaciones típicas;
- datos sobre los testigos positivos en paralelo;
- datos tabulados sobre cada madre, incluyendo: número de cuerpos amarillos por madre; número de implantes por madre; número de reabsorciones y pérdidas previas a la implantación por madre; número de implantes vivos por madre; número de implantes muertos por madre; peso de los fetos;
- los datos anteriores resumidos, respecto a cada período de apareamiento y dosis, con las frecuencias de mutaciones letales dominantes;
- análisis estadísticos y métodos aplicados.

Discusión de los resultados.

Conclusión.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OCDE, París.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, 39, 173-185
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267-270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80-85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.

- (11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21–27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.
- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- (22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.

- (23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989) . Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, Nueva York.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Producto: Sustancia o mezcla.

Cuerpo lúteo: Estructura secretora de hormonas formada en el ovario en el lugar en que un folículo ha liberado un óvulo. El número de cuerpos lúteos en los ovarios corresponde al número de óvulos que se han desprendido.

Mutación letal dominante: Mutación que se produce en una célula germinal, o se fija tras la fertilización, que provoca la muerte del embrión o del feto.

Tasa de fertilidad: Número de hembras apareadas gestantes respecto al número total de hembras apareadas.

Intervalo de apareamiento: Tiempo transcurrido entre el final de la exposición y el apareamiento de los machos tratados. Mediante el control de este intervalo pueden evaluarse los efectos del producto sobre los diferentes tipos de células germinales. En los ratones, el apareamiento durante las semanas número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 después de la finalización de las medidas de exposición afecta al esperma, espermátides condensadas, espermátides redondas, espermátocitos en paquiteno, espermátocitos en fase temprana, espermátogonios diferenciados, espermátogonios en fase de diferenciación, y espermátogonios de células precursoras.

Pérdidas previas a la implantación: Diferencia entre el número de implantes y el número de cuerpos amarillos. También puede estimarse comparando los implantes totales por hembra en los grupos tratado y testigo.

Pérdidas tras la implantación: Relación del número de implantes muertos en el grupo tratado comparada con la relación entre los implantes muertos y el total de implantes del grupo testigo.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

Apéndice 2

CRONOLOGÍA DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN LOS MAMÍFEROS

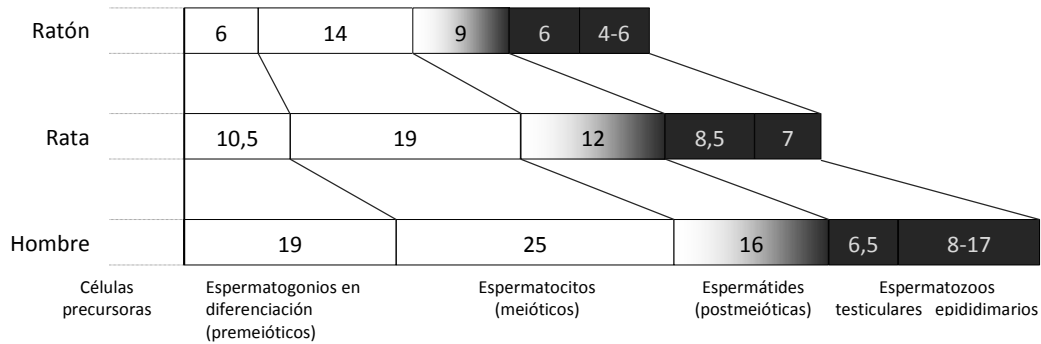


Figura 1. Comparación de la duración (en días) de desarrollo de las células germinales masculinas en ratones, ratas y hombres. Durante los periodos indicados con sombreado no se produce reparación del ADN.

Arriba se muestra un esquema de la espermatogénesis en ratones, ratas y hombres (tomado de Adler, 1996). Entre los espermatogonios sin diferenciar se incluyen los espermatogonios de tipo A sencillos; de tipo A emparejados; y de tipo A alineados (Hess & de Franca, 2008). Los espermatogonios de tipo A sencillos se consideran como las verdaderas células precursoras; por tanto, para evaluar los efectos en las células precursoras, deben pasar al menos 49 días (en el ratón) entre la última inyección de la sustancia problema y el apareamiento.

Bibliografía

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. En: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.».

4) En la parte B, el capítulo B.23 se sustituye por el texto siguiente:

«B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIOS DE MAMÍFERO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 483 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones relativas al bienestar animal. La presente versión modificada del método de ensayo refleja muchos años de experiencia con este ensayo y la posibilidad de integrar o combinar este ensayo con otros ensayos de toxicidad o genotoxicidad. La combinación de estudios de toxicidad tiene la posibilidad de reducir el número de animales utilizados en los ensayos de toxicidad. El presente método forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).
2. El ensayo de aberraciones cromosómicas en espermátogonios de mamífero *in vivo* tiene por objeto detectar los productos que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en espermátogonios de mamífero (2) (3) (4). Además, este ensayo es pertinente para evaluar la genotoxicidad porque, aunque pueden variar entre las especies, los factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN están activos y contribuyen a la respuesta. El presente método de ensayo no está diseñado para medir las anomalías numéricas; el ensayo no se utiliza normalmente con este objetivo.
3. Este ensayo mide las aberraciones cromosómicas estructurales (tanto de tipo cromosoma como de tipo cromátida) en los espermátogonios en fase de división, por lo que se espera que sirva para predecir la inducción de mutaciones hereditarias en estas células germinales.
4. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. En este ensayo se utilizan habitualmente roedores, pero en algunos casos pueden ser adecuadas otras especies, si está justificado científicamente. Las preparaciones citogenéticas normales de testículos de roedor generan metafases mitóticas (espermátogonios) y meióticas (espermátocitos). Las metafases mitóticas y meióticas se identifican sobre la base de la morfología de los cromosomas (4). Este ensayo citogenético *in vivo* detecta las aberraciones cromosómicas en las mitosis de los espermátogonios. El presente método de ensayo no se refiere a otras células diana.

6. Para detectar las aberraciones de tipo cromátida en espermatogonios, hay que examinar la primera división celular mitótica tras el tratamiento, antes de que estas aberraciones se conviertan en aberraciones de tipo cromosoma en las divisiones celulares posteriores. Puede obtenerse información adicional de los espermatocitos tratados, mediante análisis cromosómico meiótico, en relación con las aberraciones estructurales cromosómicas en diacinesia-metafase I y metafase II.
7. Existen varias generaciones de espermatogonios presentes en el testículo (5), y estos distintos tipos de células germinales pueden tener todo un espectro de sensibilidad al tratamiento con el producto. Por lo tanto, las aberraciones detectadas representan una respuesta global de las poblaciones de espermatogonios tratados. La mayoría de las células mitóticas presentes en las preparaciones de los testículos son espermatogonios B, que tienen un ciclo celular de 26 horas aproximadamente (3).
8. No procede utilizar este ensayo si hay pruebas de que el producto problema, o sus metabolitos, no llegan a los testículos.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

9. En general, los animales se exponen al producto problema por una vía adecuada y se sacrifican de forma compasiva, en momentos adecuados después del tratamiento. Antes de sacrificarlos, se tratan con un agente que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células germinales y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

10. La competencia en este ensayo debe establecerse demostrando la capacidad de reproducir los resultados previstos en cuanto a las frecuencias de las aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonios con sustancias testigo positivo (incluidas las respuestas débiles), como las que figuran en el cuadro 1, y obteniendo frecuencias con testigos negativos compatibles con un intervalo aceptable de datos de testigos en la bibliografía publicada [p. ej., (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)] o con la distribución histórica de testigos del laboratorio, si se dispone de ella.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparaciones

Selección de la especie animal

11. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Se utilizan normalmente ratones macho; no obstante, pueden utilizarse machos de otras especies adecuadas de mamíferos cuando esté científicamente justificado y para permitir

que este ensayo se lleve a cabo conjuntamente con otro método de ensayo. Debe facilitarse en el informe la justificación científica de la utilización de especies distintas de las de roedores.

Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales

12. En el caso de los roedores, la temperatura en el local de los animales debe ser de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe ser idealmente del 50-60 %, como mínimo del 40 % y preferentemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Hay que alojar a los roedores en grupos pequeños (no más de cinco animales por jaula) si no se esperan comportamientos agresivos, preferiblemente en jaulas de suelo continuo con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales pueden alojarse individualmente si está científicamente justificado.

Preparación de los animales

13. Se utilizan normalmente animales machos sanos, adultos jóvenes (8-12 semanas de edad al inicio del tratamiento) y se asignan aleatoriamente a los grupos testigo y de tratamiento. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada con el testigo positivo y el producto problema. Al empezar el estudio, la variación de peso entre los distintos animales ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 %.

Preparación de las dosis

14. Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En caso de exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, vapor o aerosol sólido/líquido, dependiendo de sus propiedades físicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

Condiciones de ensayo — disolvente/vehículo

15. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a las dosis empleadas, y no debe ser capaz de reaccionar químicamente con los productos problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la

utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos comúnmente utilizados de disolventes o vehículos compatibles el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz. A falta de información histórica o publicada sobre testigos que demuestre que un disolvente o vehículo elegido atípico no induce ninguna aberración cromosómica estructural ni otro tipo de efectos nocivos, debe realizarse un estudio inicial a fin de establecer la aceptabilidad del control del disolvente/vehículo.

Testigos positivos

16. Deben utilizarse siempre animales testigo positivo en paralelo, a menos que el laboratorio haya demostrado su competencia en la realización del ensayo y haya utilizado este de forma sistemática en los últimos años (por ejemplo, en los últimos 5 años). Si no se incluye un grupo testigo positivo en paralelo, debe contarse en cada experimento con testigos de examen (portaobjetos fijados y sin teñir). Esto puede conseguirse incluyendo en el examen del estudio muestras de referencias adecuadas que se hayan obtenido y conservado a partir de un experimento con testigo positivo aparte realizado periódicamente (por ejemplo, cada 6 o 18 meses) en el laboratorio donde se realiza el ensayo; por ejemplo, durante las pruebas de competencia y, a continuación, con carácter periódico, en caso necesario.
17. Las sustancias utilizadas como testigo positivo deben provocar con fiabilidad un aumento detectable en las frecuencias de aparición de células con aberraciones cromosómicas estructurales respecto al nivel espontáneo. Las dosis del testigo positivo deben elegirse de tal forma que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al examinador la identidad de las muestras codificadas. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias válidas como testigo positivo.

Cuadro 1: Ejemplos de sustancias testigo positivo.

Sustancias [N.º CAS] (n.º de referencia)
Ciclofosfamida (monohidrato) [n.º CAS 50-18-0 (n.º CAS 6055-19-2)] (9)
Ciclohexilamina [n.º CAS 108-91-8] (7)
Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7] (6)
Acrilamida monomérica [n.º CAS 79-06-1] (10)
Trietilenomelamina [n.º CAS 51-18-3] (8)

Testigos negativos

18. Respecto a cada tiempo de muestreo deben incluirse animales testigo negativo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, y tratados en lo demás de la misma manera que los grupos de tratamiento. Si no se tienen datos de testigos, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ninguna aberración cromosómica ni otros efectos

nocivos, deben incluirse también respecto a cada momento de muestreo animales testigo sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número de animales

19. Los tamaños de los grupos en el momento del inicio del estudio deben establecerse con el objetivo de proporcionar un mínimo de 5 machos por grupo. Se considera que este número de animales por grupo es suficiente para proporcionar una potencia estadística adecuada (es decir, que puede detectarse en general, como mínimo, una duplicación de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas cuando el nivel del testigo negativo es igual o superior al 1,0 % con una probabilidad del 80 %, con un nivel de significación de 0,05) (3) (11). Como orientación sobre las necesidades máximas típicas de animales, un estudio con dos momentos de muestreo con tres grupos tratados y un grupo testigo negativo en paralelo, más un grupo testigo positivo (cada grupo compuesto por cinco animales), requeriría 45 animales.

Pauta de tratamiento

20. Los productos problema suelen administrarse una sola vez (es decir, como un único tratamiento); pueden utilizarse otras posologías, siempre que estén científicamente justificadas.
21. En el lote al que se ha administrado la dosis máxima se toman muestras en dos momentos tras el tratamiento. Dado que el tiempo necesario para que el producto o productos problema se absorban y se metabolicen, así como su efecto sobre la cinética del ciclo celular, pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda un momento de muestreo temprano y otro tardío, a las 24 y 48 horas después del tratamiento. En relación con dosis distintas de la dosis más alta, debe hacerse un muestreo temprano a las 24 horas después del tratamiento (menos o igual que el tiempo del ciclo celular de los espermatogonios B, optimizando así la probabilidad de examinar las primeras metafases posteriores al tratamiento), a menos que se sepa que otro momento de muestreo es más adecuado y está justificado.
22. Pueden utilizarse otros momentos de muestreo. Por ejemplo, en el caso de productos que ejercen efectos independientes de la fase S, pueden ser adecuados momentos de muestreo anteriores (es decir, inferiores a 24 horas).
23. Puede utilizarse una pauta de administración repetida, por ejemplo en conjunción con un ensayo sobre otro parámetro que utilice un período de administración de 28 días (p. ej., el método B.58); sin embargo, se necesitarían grupos adicionales de animales para aplicar los diferentes tiempos de muestreo. Por consiguiente, la idoneidad de dicha pauta debe justificarse científicamente caso por caso.
24. Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o

colchicina). Se toman posteriormente muestras de los animales, a un intervalo adecuado. En el caso de los ratones y las ratas, este intervalo es de 3 a 5 horas aproximadamente.

Dosis

25. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo porque no se dispone antes de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, dicho estudio ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y pauta de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal, según las recomendaciones para la realización de estudios de determinación del intervalo (12). Este estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), definida como la dosis que induce efectos ligeramente tóxicos con respecto a la duración del período de estudio (por ejemplo, comportamiento o reacciones de tipo anormal, pequeña pérdida de peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético), pero sin llegar a provocar la muerte ni signos de dolor, sufrimiento o angustia que hagan necesaria la eutanasia (13).
26. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en los espermatozonios (por ejemplo, disminución de la proporción entre el número de mitosis de los espermatozonios y el número de metafases meióticas primera y segunda); la disminución no ha de ser superior al 50 %.
27. Los productos que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones de los criterios de establecimiento de las dosis y deben evaluarse caso por caso.
28. A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo (punto 18) y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en un estudio de determinación del intervalo o según los datos disponibles, la dosis más alta para una administración única debe ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. Si se observa toxicidad para el tejido diana (es decir, el testículo) a todas las dosis utilizadas en el ensayo, se recomienda hacer otro estudio a dosis no tóxicas. Unos estudios destinados a caracterizar de forma más completa la relación cuantitativa dosis-respuesta pueden necesitar más grupos de dosis. Estos límites pueden variar con determinados tipos de productos problema (por ejemplo, productos farmacéuticos de uso humano) a los que se apliquen requisitos específicos. Si el producto problema produce toxicidad, debe seleccionarse la dosis límite más dos dosis más bajas (según lo descrito anteriormente). La dosis límite para un período de administración de 14 días o más es de 1 000 mg/kg de peso corporal/día y, si se trata de períodos de administración de menos de 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg peso corporal/día.

Administración de las dosis

29. A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, cuando esté justificado, podrán elegirse vías de exposición como los alimentos, el agua de bebida, la tópica, la subcutánea, la intravenosa, la oral forzada (por sonda), la inhalación o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido diana. Normalmente, no se recomienda la inyección intraperitoneal, a no ser que esté justificada científicamente, ya que, por lo general, no se trata de una vía fisiológicamente pertinente de exposición humana. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el muestreo sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véase el punto 33). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar normalmente 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. Si se utilizan volúmenes superiores a estos (en caso de que lo permita la legislación sobre bienestar animal), debe justificarse. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración, para garantizar un volumen constante en relación con el peso corporal en todas las dosis.

Observaciones

30. Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al principio del estudio, al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada, y en el momento del sacrificio. En los estudios de al menos una semana de duración, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie esta y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (13).

Preparación de los cromosomas

31. Inmediatamente después del sacrificio, se obtienen suspensiones de células germinales de uno o de ambos testículos, se exponen a una solución hipotónica y se fijan según protocolos establecidos [p. ej., (2) (14) (15)]. A continuación, se extienden las células en portaobjetos y se tiñen (16) (17). Todos los portaobjetos se codifican de manera que el examinador no conozca su identidad.

Examen

32. Deben examinarse al menos 200 metafases bien extendidas de cada animal (3) (11). Si la frecuencia histórica de los testigos negativos es $< 1 \%$, debe evaluarse más de 200 células/animal para aumentar la potencia estadística (3). Deben utilizarse métodos de tinción que permitan la identificación del centrómero.
33. Las aberraciones de tipo cromosoma y de tipo cromátida deben registrarse por separado y clasificarse en subtipos (roturas, intercambios). Las separaciones se registrarán, pero no se tendrán en cuenta para determinar si un producto induce un aumento significativo de la incidencia de células con aberraciones cromosómicas. Los procedimientos utilizados en el laboratorio deben garantizar que el análisis de las aberraciones cromosómicas es realizado por examinadores bien formados. Reconociendo que los métodos de preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la consiguiente pérdida de cromosomas, las células examinadas deben, por tanto, contener un número de centrómeros no inferior a $2n \pm 2$, donde n es el número de cromosomas haploides de la especie.
34. Aunque la finalidad del ensayo es detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar las frecuencias de las células poliploides y las células con cromosomas endorreduplicados cuando se observan estos hechos (véase el punto 44).

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

35. Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. Se determinará respecto a cada animal el número de células con aberraciones cromosómicas estructurales y el número de aberraciones cromosómicas por célula. Las aberraciones de tipo cromosoma y de tipo cromátida, clasificadas por subtipos (roturas, intercambios), deben enumerarse por separado con su número y frecuencia en relación con los grupos experimentales y testigos. Las separaciones (gaps) se registran por separado. La frecuencia de las separaciones se recoge en el informe, pero por lo general no se incluye en el análisis de la frecuencia total de aberraciones cromosómicas estructurales. Se recoge en el informe el porcentaje de poliploidía y de células con cromosomas endorreduplicados, cuando se observan.
36. Deben indicarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos (según el punto 30).

Criterios de aceptabilidad

37. Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad de un ensayo.
- El testigo negativo en paralelo es coherente con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos negativos, de los que generalmente se espera que presenten una proporción de células que hayan sufrido aberraciones cromosómicas $> 0 \%$ y $\leq 1,5 \%$, y con los datos de testigos históricos del laboratorio, si estos están disponibles (véanse los puntos 10 y 18).

- Los testigos positivos en paralelo inducen respuestas coherentes con las normas publicadas sobre los datos históricos de los testigos positivos, o con la base de datos de testigos históricos positivos del laboratorio, si estos están disponibles, y producen un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo (véanse los puntos 17 y 18).
- Se han analizado números apropiados de células y de dosis (véanse los puntos 28 y 32).
- Los criterios para la selección de la dosis más elevada son coherentes con los descritos en los puntos 25 y 26.

38. Si se observan tanto mitosis como meiosis, debe determinarse la proporción entre las mitosis de los espermatogonios y las metafases meióticas primera y segunda, como medida de la citotoxicidad para todos los animales tratados y testigo negativo, en una muestra total de 100 células en división por animal. Si se observan mitosis únicamente, se determinará el índice mitótico al menos en 1 000 células por animal.

Evaluación e interpretación de los resultados

39. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con el producto problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta.

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

- al menos una de las dosis de ensayo produce un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;
- el aumento está relacionado con la dosis al menos en un momento de muestreo; y
- alguno de los resultados está fuera del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces capaz de inducir aberraciones cromosómicas en los espermatogonios de los animales de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (11) (18). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

41. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si:

- ninguna de las dosis de ensayo presenta un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;
- no hay ningún aumento relacionado con la dosis en ninguna de las condiciones experimentales; y

- todos los resultados están dentro del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir aberraciones cromosómicas en los espermatogonios de los animales de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (11) (18). Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el producto pueda inducir aberraciones cromosómicas en fases de desarrollo posteriores no estudiadas, o mutaciones génicas.

42. No se requiere ninguna verificación de una respuesta positiva clara o negativa clara.
43. Si la respuesta no es claramente negativa o positiva, y para ayudar a determinar la pertinencia biológica de un resultado (p. ej., un incremento débil o dudoso), los datos deben ser evaluados por expertos o mediante otras investigaciones utilizando los datos experimentales existentes, como la consideración de si el resultado positivo se encuentra fuera del intervalo aceptable de datos de los testigos negativos o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (19).
44. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.
45. El aumento del número de células poliploides puede indicar que el producto problema es capaz de inhibir procesos mitóticos y de inducir aberraciones cromosómicas numéricas (20). Un aumento del número de células con cromosomas endorreduplicados puede indicar que el producto problema es capaz de inhibir el progreso del ciclo celular (21) (22), que es un mecanismo de inducir alteraciones cromosómicas numéricas diferente de la inhibición de procesos mitóticos (véase el punto 2). Por consiguiente, deben consignarse por separado la incidencia de células poliploides y de células con cromosomas endorreduplicados.

Informe del ensayo

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

Resumen.

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;
- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Preparación del producto problema:

- justificación de la elección del vehículo;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo.
- preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;
- determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales) si se realizan.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas y justificación de su utilización;
- número y edad de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- método para la identificación individual de los animales;
- en el caso de estudios a corto plazo: peso individual de los animales al inicio y al final del ensayo; en el caso de estudios de duración superior a una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos. Deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

Condiciones del ensayo:

- datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);
- datos del estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;
- justificación de la selección de las dosis;
- justificación de la elección de la vía de administración;
- datos de la preparación del producto problema;
- datos sobre la administración del producto problema;

- fundamento de la elección del momento del sacrificio;
- métodos de determinación de la toxicidad para los animales, incluidos los eventuales análisis histopatológicos o hematológicos, y frecuencia con que se han medido los pesos corporales y se han realizado las observaciones de los animales;
- métodos de comprobación de que el producto problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;
- dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;
- método de sacrificio;
- método de analgesia (en su caso);
- procedimientos para aislar los tejidos;
- identidad del producto que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento,
- métodos de preparación de los portaobjetos;
- criterios de examen de las aberraciones;
- número de células analizadas por animal;
- criterios empleados para considerar que los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- estado de los animales antes del ensayo y a lo largo de este, incluidos los signos de toxicidad;
- peso corporal y de los órganos en el momento del sacrificio (si se emplean varios tratamientos, pesos corporales tomados durante la pauta de tratamiento);
- signos de toxicidad;
- índice mitótico;
- relación entre el número de espermatogonios con mitosis y el número de metafases meióticas primera y segunda, u otras pruebas de exposición del tejido diana;
- tipo y número de aberraciones observadas en cada animal por separado;
- número total de aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;
- número de células con aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos y métodos aplicados;

- datos de los testigos negativos en paralelo;
- datos históricos de testigos negativos, con intervalos, medias, desviaciones típicas y un intervalo de confianza del 95 % (en su caso), o datos históricos de los testigos negativos históricos publicados utilizados para determinar la aceptabilidad de los resultados de los ensayos;
- datos sobre los testigos positivos en paralelo;
- variaciones de la ploidía, en su caso, incluidas las frecuencias de poliploidía y/o de células endorreduplicadas.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OCDE, París.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19-30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
- (13) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

Apéndice

DEFINICIONES

Aneuploidía: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

Centrómero: Región o regiones de un cromosoma con las que se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Producto: Sustancia o mezcla.

Diversidad de los cromosomas: Diversidad de las formas (p. ej., metacéntricos, acrocéntricos, etc.) y tamaños de los cromosomas.

Aberración de tipo cromátida: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de cromátidas solas o en la rotura y reunión entre cromátidas.

Aberración de tipo cromosoma: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura, o en la rotura y reunión, de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Clastógeno: Producto que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

Separación (gap): Lesión acromática más estrecha que la anchura de una cromátida, y con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o de los cromosomas, con inclusión de roturas, deleciones, aductos, modificaciones y uniones de nucleótidos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

Índice mitótico (IM): Relación entre el número de células en metafase y el número total de células observadas en una población celular; indica el grado de proliferación de dicha población.

Mitosis: División del núcleo celular, generalmente compuesta por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

Anomalía numérica: Cambio del número de cromosomas respecto al número normal característico de los animales empleados.

Poliploidía: Múltiplo del número cromosómico haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: Cambio de la estructura cromosómica detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular, observado como deleciones y fragmentos,

intercambios.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

5) En la parte B, el capítulo B.40 se sustituye por el texto siguiente:

«B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO DE RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÁNEA (RET)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 430 de la OCDE (2015). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, tras la aplicación de un producto problema [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹]. El presente método de ensayo B.40 actualizado establece un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas (1) y al CLP.
2. La evaluación de la corrosividad cutánea suele implicar el uso de animales de laboratorio (método B.4, equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE, adoptadas originalmente en 1981 y revisadas en 1992, 2002 y 2015) (2). Además del presente método de ensayo B.40, se han validado otros métodos de ensayo *in vitro* para detectar el potencial de corrosión cutánea de los productos químicos, y se han adoptado como método de ensayo B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayo TG 431 de la OCDE) (3) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (4), que también pueden identificar subcategorías de productos químicos corrosivos cuando sea necesario. Varios métodos de ensayo *in vitro* validados se han adoptado como método de ensayo B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) (5), para utilizarlo en el ensayo de irritación cutánea. Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (6).

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.008, p. 1).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en el método de ensayo de la resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata (RET), que utiliza discos de piel para detectar sustancias corrosivas por su capacidad de provocar una pérdida de la integridad y de la función de barrera del estrato córneo normal. Las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE se adoptaron originalmente en 2004 y se actualizaron en 2015 para referirse al documento de orientación sobre los IATA.
4. Para evaluar los ensayos de corrosión cutánea *in vitro* con fines normativos, se llevaron a cabo estudios de prevalidación (7), seguidos de un estudio formal de validación del método de ensayo RET con piel de rata para evaluar la corrosión cutánea (8) (9) (10) (11). El resultado de estos estudios llevó a la recomendación de que el método de ensayo RET (designado como el método de referencia validado, MRV) podía utilizarse con fines normativos para la evaluación de la corrosividad cutánea *in vivo* (12) (13) (14).
5. Antes de que pueda utilizarse con fines normativos para evaluar la corrosión cutánea un método de ensayo RET *in vitro* similar o modificado distinto del MRV, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con el MRV, de acuerdo con los requisitos de las normas de comportamiento (15). La aceptación mutua de datos por la OCDE solo se garantizará tras la revisión y la inclusión en las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE de cualquier método de ensayo nuevo o actualizado propuesto.

DEFINICIONES

6. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES

7. Un estudio de validación (10) y otros estudios publicados (16) (17) han comunicado que el método de ensayo RET con piel de rata puede discriminar entre agentes conocidos corrosivos y no corrosivos para la piel, con una sensibilidad global del 94 % (51/54) y una especificidad del 71 % (48/68) en relación con una base de datos de 122 sustancias.
8. El presente método de ensayo aborda la corrosión cutánea *in vitro*. Permite la identificación de productos problema no corrosivos y corrosivos, de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Una limitación de este método de ensayo, demostrada por los estudios de validación (8) (9) (10) (11), es que no permite la subcategorización de sustancias y mezclas corrosivas de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP. El marco normativo aplicable determinará cómo se utilizará el presente método de ensayo. Aunque este no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 aborda específicamente el aspecto de la irritación cutánea *in vitro* (5). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los IATA (6).

9. Durante la validación en que se basa el presente método se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos que representan principalmente sustancias, y la base de datos empíricos del estudio de validación contaba con 60 sustancias que cubrían una amplia gama de clases químicas (8) (9). Sobre la base del conjunto de datos disponibles, el método de ensayo es aplicable a una amplia gama de clases químicas y estados físicos, incluidos líquidos, semisólidos, sólidos y ceras. Sin embargo, dado que para ciertos estados físicos específicos no se dispone fácilmente de productos de ensayo con datos de referencia adecuados, hay que señalar que durante la validación se evaluó un número relativamente pequeño de ceras y de sólidos corrosivos. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. En los casos en que haya pruebas sobre la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de sustancias, el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de sustancias. Además, se supone que este método de ensayo es aplicable a las mezclas como una extensión de su aplicabilidad a las sustancias. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas (por ejemplo, a raíz de una estrategia como la propuesta por Eskes *et al.*, 2012) (18), el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Aún no se han efectuado estudios de validación de gases y aerosoles (8) (9). Aunque no hay que descartar que estos tipos de productos puedan estudiarse utilizando el método de ensayo RET, el método actual no permite ensayar gases ni aerosoles.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. El producto problema se aplica durante un máximo de 24 horas en la superficie epidérmica de discos de piel en un sistema de ensayo bicompartimental, donde los discos hacen de separación entre los compartimentos. Los discos de piel se toman de ratas, sacrificadas de forma compasiva a los 28 o 30 días de edad. Las sustancias corrosivas se caracterizan por su capacidad de producir una pérdida de la integridad y de la función de barrera del estrato córneo normal, pérdida que se mide como reducción de la RET por debajo de un umbral (32). En relación con la RET de ratas, se ha elegido un valor límite de 5 k Ω basándose en muchos datos sobre una amplia gama de sustancias, de las que la gran mayoría presentaba unos valores claramente bien por encima (a menudo > 10 k Ω) o bien por debajo (a menudo < 3 k Ω) de este valor (16). Generalmente, los productos problema que no son corrosivos para los animales, tanto si son irritantes como si no, no reducen el valor de la RET por debajo de este límite. Por otra parte, el uso de otros preparados de piel o de otros equipos puede alterar el valor límite, lo que haría necesaria otra validación.

11. Se incorpora al procedimiento una fase de fijación de colorante para confirmar los resultados positivos con la RET, incluidos los casos de valores próximos a 5 kΩ. La fase de fijación del colorante determina si el aumento de la permeabilidad iónica se debe a la destrucción física del estrato córneo. Se ha visto que el método RET con piel de rata sirve para predecir el valor de la corrosividad del conejo *in vivo*, evaluada según el método de ensayo B.4 (2).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

12. Antes de proceder al uso sistemático del método de ensayo RET con piel de rata, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recomendadas en el cuadro 1. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (16)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

Cuadro 1: Lista de sustancias para la prueba de la competencia¹

Sustancia	N.º CAS	Clase química ²	Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP basada en resultados <i>in vivo</i> ³	Cat. según los resultados del MRV <i>in vitro</i> ³	Estado físico	pH ⁴
Corrosivos <i>in vivo</i>						
N,N'-Dimetil-dipropilentiaramina	10563-29-8.	Base orgánica	1A	6 x C	L	8,3
1,2-Diaminopropano	78-90-0	Base orgánica	1A	6 x C	L	8,3
Ácido sulfúrico (10 %)	7664-93-9	Ácido inorgánico	(1A)/1B/1C	5 x C 1x NC	L	1,2
Hidróxido de potasio (ac. al 10 %)	1310-58-3	Base inorgánica	(1A)/1B/1C	6 x C	L	13,2
Ácido octanoico (caprílico)	124-07-2	Ácido orgánico	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,6
2- <i>terc</i> -Butilfenol	88-18-6	Fenol	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,9
No corrosivos <i>in vivo</i>						
Ácido isoesteárico	2724-58-5	Ácido orgánico	NC	6 x NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgánica	NC	6 x NC	S	5,5
Bromuro de fenetilo	103-63-9	Electrófilo	NC	6 x NC	L	3,6

Sustancia	N.º CAS	Clase química ²	Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP basada en resultados <i>in vivo</i> ³	Cat. según los resultados del MRV <i>in vitro</i> ³	Estado físico	pH ⁴
4-(Metiltio)-benzaldehído	3446-89-7	Electrófilo	NC	6 x NC	L	6,8
1,9-Decadieno	1647-16-1	Orgánico neutro	NC	6 x NC	L	3,9
Tetracloroetileno	127-18-4	Orgánico neutro	NC	6 x NC	L	4,5

Abreviaturas: ac = solución acuosa; N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; MRV = método de referencia validado.

¹ Las sustancias para la prueba de la competencia se seleccionaron de entre las sustancias utilizadas en el estudio de validación del CEVMA del método de ensayo RET con piel de rata, utilizando primero el criterio de corrosivas frente a no corrosivas, después el de subcategoría de corrosivas y finalmente el de clase química (8) (9). Salvo que se indique lo contrario, las sustancias se sometieron a prueba al nivel de pureza obtenido cuando se compran de una fuente comercial (8). En la selección se incluyeron, en la medida de lo posible, sustancias que: i) son representativas de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., sustancias no corrosivas; sustancias débilmente corrosivas a fuertemente corrosivas) que el MRV puede medir o predecir; ii) son representativas de las clases químicas utilizadas en el estudio de validación; iii) reflejan las características de comportamiento del MRV; iv) tienen estructuras químicas bien definidas; v) dan resultados definitivos con el método de ensayo de referencia *in vivo*; vi) están disponibles en el comercio; y vii) no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos.

²Clase química asignada por Barratt *et al.* (8).

³Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

⁴Los valores de pH se obtuvieron de Fentem *et al.* (9) y de Barratt *et al.* (8).

PROCEDIMIENTO

- Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para el método de ensayo de corrosión cutánea RET con piel de rata (19). Los métodos de ensayo RET con piel de rata contemplados en el presente método de ensayo deben cumplir las condiciones siguientes:

Animales

- Deben utilizarse ratas porque la sensibilidad de su piel a las sustancias consideradas en el presente método de ensayo se ha demostrado previamente (12) y es la única fuente de piel que se ha validado oficialmente (8) (9). La edad (en el momento de tomar la piel) y la cepa de la rata son especialmente importantes para conseguir que los folículos pilosos estén en fase latente antes de que se inicie el crecimiento del pelo de los adultos.
- Se quita cuidadosamente con maquinilla pequeña el pelo dorsal y lateral de ratas jóvenes, de unos 22 días de edad, machos o hembras, de una cepa derivada de la Wistar o de otra comparable. A continuación se lavan los animales frotándolos cuidadosamente al mismo tiempo

que se cubre la zona pelada con una solución antibiótica (que contenga, por ejemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol y anfotericina en concentraciones que sean eficaces para inhibir el crecimiento bacteriano). Los animales se vuelven a lavar con antibióticos al tercer o cuarto día después del primer lavado y se utilizan en el plazo de 3 días desde el segundo lavado, cuando el estrato córneo se ha recuperado de la eliminación del pelo.

Preparación de los discos de piel

16. Los animales se sacrifican de forma compasiva cuando tienen entre 28 y 30 días de edad; esta edad es crítica. A continuación se retira la piel dorsolateral de cada animal y se le quita el exceso de grasa subcutánea, separando esta cuidadosamente de la piel. Se toman discos de piel de un diámetro aproximado de 20 mm. Puede guardarse la piel antes de utilizar los discos si se demuestra que los datos obtenidos con controles positivos y negativos son equivalentes a los obtenidos con piel fresca.
17. Cada disco de piel se coloca sobre uno de los extremos de un tubo de PTFE (politetrafluoroetileno), comprobando que la superficie epidérmica esté en contacto con el mismo. Se coloca a presión un anillo de goma en el extremo del tubo para mantener la piel en su sitio y se recorta el tejido sobrante. Después se sella con cuidado el anillo de goma al extremo del tubo de PTFE con vaselina. El tubo se sujeta mediante una pinza de muelle dentro de una cámara receptora que contiene una solución de MgSO_4 (154 mM) (figura 1). El disco de piel debe quedar totalmente sumergido en la solución de MgSO_4 . De la piel de una sola rata pueden obtenerse hasta 10 o 15 discos de piel. En la figura 2 se dan las dimensiones del anillo y del tubo.
18. Antes del inicio de las pruebas, se mide la RET de dos discos de piel, como procedimiento de control de calidad de la piel de cada animal. El valor de la resistencia de ambos discos debe ser superior a 10 k Ω para que los discos restantes puedan utilizarse en el método de ensayo. Si el valor de la resistencia es inferior a 10 k Ω , hay que desechar los discos restantes de la misma piel.

Aplicación del producto problema y de las sustancias testigo

19. En cada tanda (experimento) deben utilizarse a la vez testigos positivos y negativos para garantizar el comportamiento adecuado del modelo experimental. Deben utilizarse en cada tanda (experimento) discos de piel procedentes de un solo animal. Las sustancias testigo positivo y negativo que se proponen son ácido clorhídrico 10 M y agua destilada, respectivamente.
20. En el caso de los productos problema líquidos, se aplican uniformemente a la superficie epidérmica dentro del tubo 150 μl . Cuando se prueban materias sólidas, se aplica uniformemente al disco una cantidad suficiente del sólido de tal manera que quede cubierta toda la superficie de la epidermis. A continuación se vierte encima del sólido agua desionizada (150 μl) y se agita suavemente el tubo. A fin de conseguir el contacto máximo con la piel, es

posible que los sólidos deban calentarse a 30 °C para fundir o reblandecer el producto problema, o bien molerse para obtener polvo o material granuloso.

21. Se utilizan tres discos de piel para cada producto problema y sustancia testigo en cada tanda (experimento) del ensayo. Los productos problema se aplican durante 24 horas a 20-23 °C. El producto problema se elimina lavando con un chorro de agua del grifo a temperatura ambiente hasta que no pueda eliminarse más material.

Mediciones de la RET

22. La impedancia de la piel se mide como RET utilizando un puente de Wheatstone de baja tensión y de corriente alterna (18). Las especificaciones generales del puente son una tensión de funcionamiento de 1-3 V, una corriente alterna de forma sinusoidal o rectangular de 50 - 1 000 Hz, y un intervalo de medición como mínimo de 0,1 a -30 kΩ. El puente utilizado en el estudio de validación medía valores de inductancia, capacitancia y resistencia de hasta 2 000 H, 2 000 μF, y 2 MΩ, respectivamente, a frecuencias de 100 Hz o 1 kHz, utilizando montajes en serie o en paralelo. A efectos de la RET, las mediciones del ensayo de corrosividad se registran como resistencia, a la frecuencia de 100 Hz y utilizando montajes en serie. Antes de medir la resistencia eléctrica, se reduce la tensión superficial de la piel añadiendo un volumen de etanol al 70 % suficiente para cubrir la epidermis. Tras unos segundos se retira el etanol del tubo y después se hidrata el tejido aplicando 3 ml de una solución de MgSO₄ (154 mM). Los electrodos del puente se colocan a ambos lados del disco de piel para medir la resistencia en kΩ/disco de piel (figura 1). En la figura 2 se dan las dimensiones de los electrodos y la longitud del electrodo expuesta por debajo de las pinzas de cocodrilo. La pinza que sujeta el electrodo interior se apoya encima del tubo de PTFE durante la medición de la resistencia para asegurarse de que es constante la longitud del electrodo que queda sumergida en la solución de MgSO₄. El electrodo exterior se coloca dentro de la cámara receptora de manera que se apoye en el fondo de la misma. La distancia entre la pinza de muelle y el fondo del tubo de PTFE se ha de mantener constante (figura 2), ya que afecta al valor de la resistencia obtenido. Por tanto, la distancia entre el electrodo interior y el disco de piel debe ser constante y mínima (1-2 mm).
23. Si el valor medido de la resistencia es superior a 20 kΩ, puede deberse a que haya restos del producto problema recubriendo la superficie epidérmica del disco de piel. Puede intentarse mejorar la eliminación de este recubrimiento, por ejemplo sellando el tubo de PTFE con el pulgar cubierto de un guante y agitándolo aproximadamente diez segundos; se descarta la solución de MgSO₄ y se repite la medición de la resistencia con nuevo MgSO₄.
24. Las propiedades y dimensiones del instrumental y el procedimiento experimental utilizado pueden influir en los valores obtenidos de RET. El umbral de corrosión de 5 kΩ se ha determinado a partir de datos obtenidos con el instrumental y el procedimiento concretos descritos en el presente método. Si se modifican las condiciones del ensayo o se utiliza un instrumental diferente, es posible que deban aplicarse diferentes valores umbral y de los testigos. Por tanto, es necesario calibrar el método y los valores umbral de resistencia

sometiendo a ensayo una serie de sustancias para la prueba de la competencia elegidas de entre las sustancias utilizadas en el estudio de validación (8) (9) o de clases químicas similares a las sustancias problema. En el cuadro 1 se indica una serie de sustancias adecuadas para la prueba de la competencia.

Métodos de fijación de colorante

25. La exposición a determinados materiales no corrosivos puede dar lugar a una reducción de la resistencia por debajo del umbral de 5 k Ω por permitir el paso de iones a través del estrato córneo, reduciendo así la resistencia eléctrica (9). Por ejemplo, las sustancias orgánicas neutras y las que tienen propiedades tensoactivas (incluidos los detergentes, emulgentes y otros agentes tensoactivos) pueden eliminar lípidos cutáneos, lo que aumenta la permeabilidad de la barrera a los iones. Así pues, si los valores de RET obtenidos con tales productos están por debajo o cerca de 5 k Ω , sin que visualmente se aprecien lesiones en los discos de piel, deberá efectuarse una evaluación de la penetración de colorante en los tejidos tratado y testigo, a fin de determinar si los valores de RET obtenidos son resultado de un aumento de la permeabilidad de la piel o bien de la corrosión de esta (7) (9). En este último caso, si el estrato córneo está erosionado, el colorante sulforrodamina B aplicado a la superficie de la piel penetra rápidamente en el tejido subyacente y lo tiñe. Este colorante en particular es estable ante una amplia gama de sustancias y no se ve afectado por el procedimiento de extracción que se describe más abajo.

Aplicación y eliminación del colorante sulforrodamina B

26. Tras la evaluación de la RET, se retira el sulfato de magnesio del tubo y se examina cuidadosamente la piel para detectar la presencia de lesiones evidentes. Si no hay ninguna lesión importante evidente (p. ej., una perforación), se aplican durante 2 horas en la superficie epidérmica de cada disco de piel 150 μ l de una disolución al 10 % (p/v) en agua destilada del colorante sulforrodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; n.º CAS 3520-42-1). Después se lavan estos discos de piel con agua del grifo, durante unos 10 segundos y a temperatura no superior a la ambiente, para eliminar el exceso de colorante no fijado. Cada disco de piel se retira cuidadosamente del tubo de PTFE y se coloca en un frasco (por ejemplo, un frasco de cristal de centelleo de 20 ml) con agua desionizada (8 ml). Los frascos se agitan suavemente durante 5 minutos para eliminar los eventuales restos de colorante no fijado. Este procedimiento de aclarado se repite a continuación, después de lo cual se retiran los discos cutáneos y se colocan en frascos que contengan 5 ml de dodecilsulfato sódico (DSS) al 30 % (p/v) en agua destilada y se dejan incubar una noche a 60 °C.
27. Después de la incubación, se retiran y desechan los discos de piel y la solución restante se centrifuga durante 8 minutos a 21 °C (fuerza centrífuga relativa $\sim$ 175 x g). Luego, se diluye de 1 a 5 (v/v) [es decir, 1 ml + 4 ml] una alícuota de 1 ml del sobrenadante con dodecilsulfato sódico al 30 % (p/v) en agua destilada. Se mide la densidad óptica (DO) de la solución a 565 nm.

Cálculo del contenido de colorante

28. El contenido en colorante sulforrodamina B por disco se calcula a partir de los valores de DO (9) (coeficiente de extinción molar del colorante sulforrodamina B a 565 nm = $8,7 \times 10^4$; peso molecular = 580). Se determina el contenido de colorante de cada disco de piel utilizando una curva de calibración adecuada, y después se calcula la media del contenido de colorante de las muestras paralelas.

Criterios de aceptabilidad

29. Los resultados medios de la RET se aceptan a condición de que los valores de los testigos positivos y negativos correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método en el laboratorio de ensayo. Los intervalos aceptables de resistencia con el método y con el instrumental antes descritos se indican en el cuadro siguiente:

Testigo	Sustancia	Intervalo de resistencia (k Ω)
Positivo	Ácido clorhídrico 10 M	0,5 - 1,0
Negativo	Agua destilada	10 - 25

30. Los resultados medios de fijación del colorante se aceptan a condición de que los valores de los testigos correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método. En el cuadro siguiente se dan los intervalos de contenido de colorante aceptables que se proponen para las sustancias testigo con el método y el instrumental antes descritos:

Testigo	Sustancia	Intervalo del contenido de colorante (μ g/disco)
Positivo	Ácido clorhídrico 10 M	40 - 100
Negativo	Agua destilada	15 - 35

Interpretación de los resultados

31. El valor límite de la RET que separa los productos corrosivos de los no corrosivos se estableció durante la optimización del método de ensayo, se sometió a prueba durante una fase de validación previa y se confirmó en un estudio formal de validación.
32. A continuación se recoge el modelo de predicción del método de ensayo RET de corrosión cutánea con piel de rata (9) (19), asociado al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP:

Se considera que el producto problema no es corrosivo para la piel:

- si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es superior a ($>$) 5 k Ω , o
 - si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a ($\leq$) 5 k Ω , y
- los discos de piel no presentan lesiones evidentes (por ejemplo, una perforación), y

- el contenido medio de colorante del disco es inferior ($<$) al contenido medio de colorante del disco del testigo positivo de HCl 10 M obtenido en paralelo (véase el punto 30 respecto a los valores de los testigos positivos).

Se considera que el producto problema es corrosivo para la piel:

- i) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a ($\leq$) 5 k Ω y los discos de piel tienen lesiones evidentes (p. ej., están perforados), o
- ii) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a ($\leq$) 5 k Ω , y
- los discos de piel no presentan lesiones evidentes (p. ej., una perforación), pero
- el contenido medio de colorante del disco es superior o igual ($\geq$) al contenido medio de colorante del disco del testigo positivo de HCl 10 M obtenido en paralelo (véase el punto 30 respecto a los valores de los testigos positivos).

33. Una sola tanda (experimento) del ensayo, formada por al menos tres réplicas de discos de piel, debería ser suficiente para un producto problema, si la clasificación es clara. Sin embargo, en caso de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de una RET media igual a $5 \pm 0,5$ k Ω , debe plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda (experimento), así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras tandas (experimentos).

DATOS E INFORME

Datos

34. Deben indicarse en un cuadro los valores de resistencia (k Ω) y los valores de contenido de colorante (μ g/disco), en su caso, correspondientes al producto problema, así como a los testigos positivos y negativos, incluyendo los datos de cada réplica de los discos en cada tanda (experimento) del ensayo y los valores medios $\pm$ DT. Deben recogerse en el informe todos los experimentos repetidos. Se deben notificar las lesiones observadas en los discos de piel en relación con cada producto problema.

Informe del ensayo

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

Producto problema y sustancias testigo:

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;
- Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el guion anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

- Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- Origen; número de lote, si está disponible;
- Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;
- Condiciones de conservación.

Animales de ensayo:

- Cepa y sexo utilizados;
- Edad de los animales cuando se utilizan como donantes;
- Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- Datos de la preparación de la piel.

Condiciones de ensayo:

- Curvas de calibración del instrumental del ensayo;
- Curvas de calibración sobre el comportamiento del ensayo de fijación de colorante, ancho de banda utilizado para medir los valores de DO, e intervalo de linealidad de la DO del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro), si procede;
- Datos del procedimiento utilizado para las mediciones de la RET;
- Datos del procedimiento utilizado para la evaluación de la fijación de colorante, en su caso;
- Dosis utilizadas en el ensayo, duración del período o períodos de exposición y temperatura o temperaturas de exposición;
- Datos sobre el procedimiento de lavado utilizado después del período de exposición;
- Número de réplicas de los discos de piel utilizadas por producto problema y testigos (testigos positivo y negativo);
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;
- Referencia a datos históricos del modelo. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:
 - i) Aceptabilidad de los valores de la RET de los testigos positivo y negativo (en $k\Omega$) con referencia a los intervalos de resistencia de los testigos positivo y negativo;
 - ii) Aceptabilidad de los valores del contenido en colorantes de los testigos positivo y negativo (en $\mu\text{g}/\text{disco}$) con referencia a los intervalos de contenido en colorantes de los testigos positivo y negativo;
 - iii) Aceptabilidad de los resultados de los ensayos con referencia a la variabilidad histórica de las réplicas de discos de piel;
- Descripción de los criterios de decisión / modelo de predicción aplicados.

Resultados:

- Cuadro de datos de los ensayos RET y de unión de colorante (si procede) en relación con distintos productos problema y testigos, respecto a cada tanda (experimento) del ensayo y cada réplica de disco de piel (cada animal y cada muestra de piel), promedios, desviaciones típicas y coeficientes de variación;
- Descripción de los eventuales efectos observados;
- Clasificación derivada con referencia al modelo de predicción y/o a los criterios de decisión utilizados.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: [\[http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html\]](http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html).
- (2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.
- (3) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*.
- (4) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.
- (5) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida.
- (6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of

- Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
 - (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
 - (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDermTM (EPI-200), EPISKINTM (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
 - (15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
 - (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
 - (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191-194.
 - (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
 - (19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
 - (20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.

Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment
(No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

FIGURA 1: INSTRUMENTAL PARA EL ENSAYO DE LA RET EN PIEL DE RATA

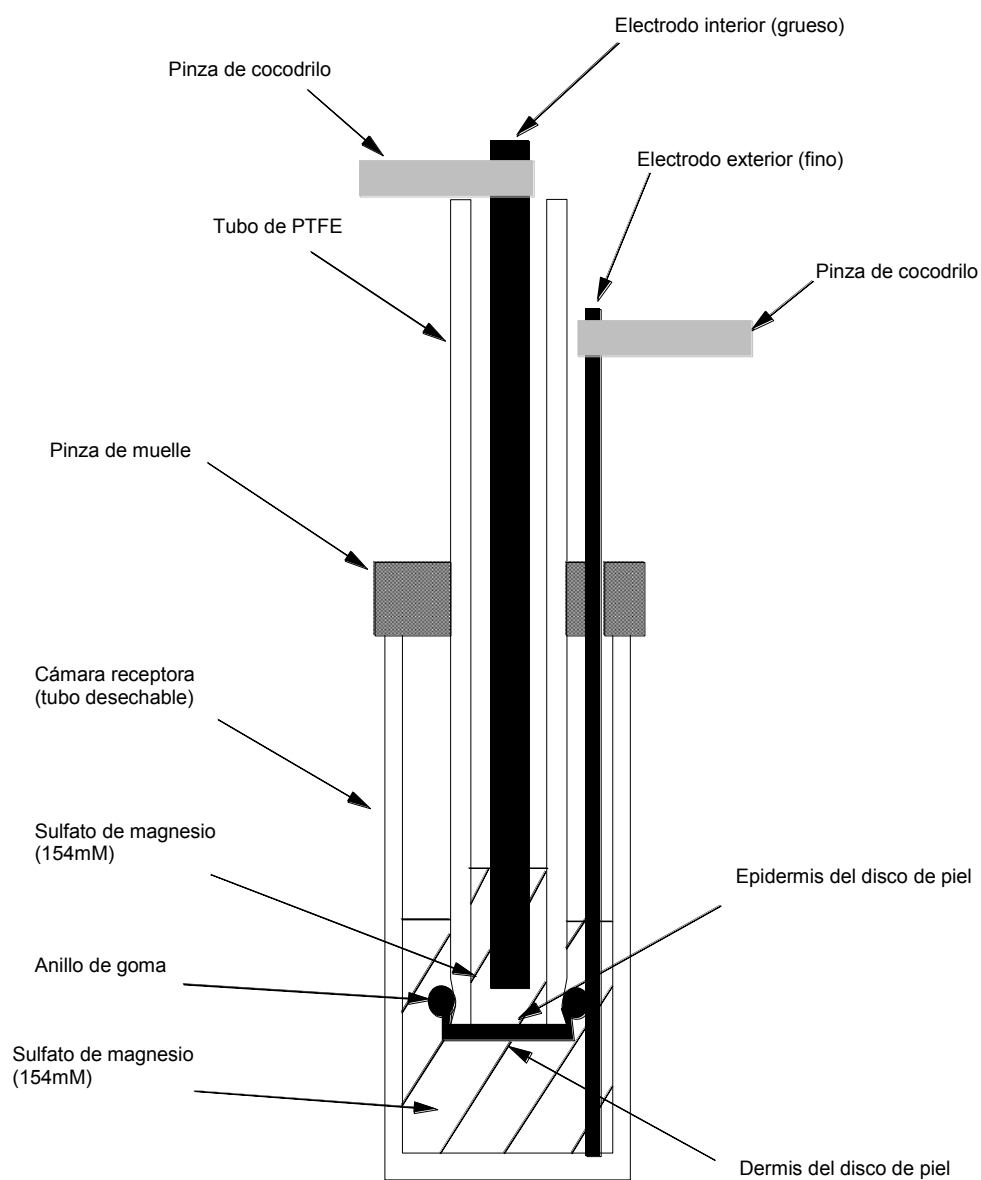
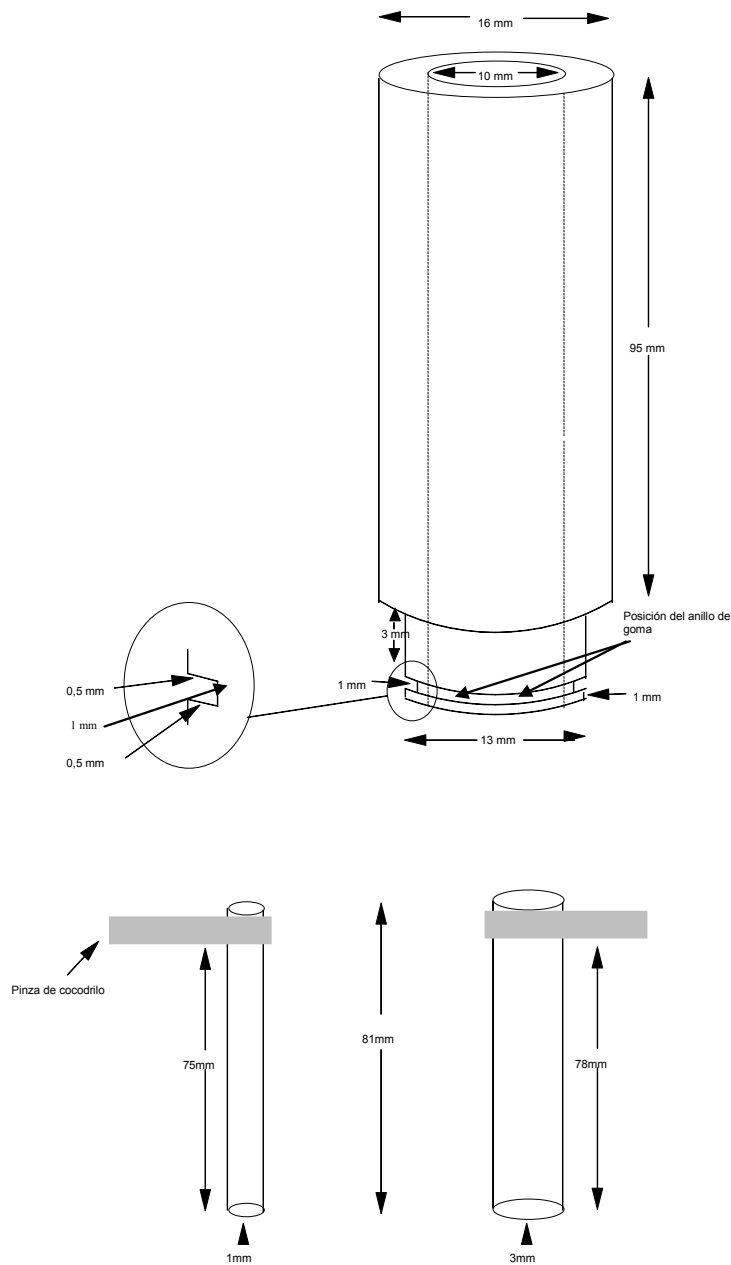


FIGURA 2: DIMENSIONES DEL TUBO DE POLITETRAFLUORETILENO (PTFE), DE LA CÁMARA RECEPTORA Y DE LOS ELECTRODOS USADOS



Factores críticos del instrumental mostrado arriba:

- El diámetro interior del tubo de PTFE,
- La longitud de los electrodos respecto al tubo de PTFE y a la cámara receptora, de forma que el disco de piel no toque los electrodos y que haya en contacto con la solución de MgSO_4 una longitud fijada de electrodo,

- La cantidad de solución de MgSO_4 presente en la cámara receptora debe hacer que el líquido tenga cierta profundidad respecto al nivel dentro del tubo de PTFE, como se indica en la figura 1,
- El disco de piel debe fijarse bien al tubo de PTFE, de forma que la resistencia eléctrica sea una medida fiel de las propiedades de la piel.

Apéndice

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (20).

C: Corrosivo.

Producto: Sustancia o mezcla.

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categórico, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “exactitud” se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (20).

SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos) de las Naciones Unidas: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

IATA: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

Mezcla: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

NC: No corrosivo.

DO: Densidad óptica.

TP: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que

se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe presentar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia.

Pertinencia: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (20).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (20).

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (20).

Corrosión cutánea *in vitro*: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

Especificidad: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (20).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Tanda (del ensayo): Un solo producto problema sometido a ensayo al mismo tiempo con un mínimo de tres réplicas de discos de piel.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Resistencia eléctrica transcutánea (RET): Medida de la impedancia eléctrica de la piel, como valor de la resistencia en kiloohmios. Un método simple y sólido para evaluar la función de barrera consiste en registrar el paso de iones a través de la piel mediante el uso de un puente de Wheatstone.

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos. ».

6) En la parte B, el capítulo B.40 *bis* se sustituye por el texto siguiente:

«B.40 *bis*. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA (EHR)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 431 de la OCDE (2016). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹]. El presente método de ensayo B.40 *bis* actualizado establece un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP. También permite una subcategorización parcial de los productos corrosivos.
2. La evaluación del potencial de corrosión cutánea de los productos químicos ha supuesto normalmente la utilización de animales de laboratorio (método de ensayo B.4 equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE); aprobada originalmente en 1981 y revisada en 1992, 2002 y 2015) (2). Además del presente método de ensayo B.40 *bis*, se han validado otros dos métodos de ensayo *in vitro* para detectar el potencial de corrosión de los productos químicos, y se han adoptado como método de ensayo B.40 (equivalente a las directrices de ensayo TG 430 de la OCDE) (3) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (4). Además, se ha adoptado el método de ensayo *in vitro* B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) (5) para comprobar el potencial de irritación cutánea. Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (6).

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado corrosión cutánea. Este método hace uso de la epidermis humana reconstruida (EHR) (obtenida a partir de queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos) que imita bien las propiedades histológicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de las partes superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. Las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE se adoptaron originalmente en 2004 y se actualizaron en 2013 para incluir métodos de ensayo adicionales que utilizan los modelos de EHR y la posibilidad de utilizar los métodos para apoyar la subcategorización de los productos corrosivos, y se actualizaron de nuevo en 2015 para hacer referencia al documento de orientación sobre los IATA e introducir el uso de un procedimiento alternativo de medición de la viabilidad.
4. En este método de ensayo se incluyen cuatro modelos EHR validados disponibles comercialmente. Se han efectuado estudios de prevalidación (7), seguidos de un estudio formal de validación para evaluar la corrosión cutánea (8) (9) (10) (11) (12), de dos de estos modelos de ensayo disponibles en el mercado, a saber, EpiSkin™ Standard Model (SM) y EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (denominados en lo sucesivo «métodos de referencia validados», MRV). El resultado de estos estudios llevó a la recomendación de que los dos MRV mencionados podrían utilizarse con fines normativos para distinguir las sustancias corrosivas (C) de las sustancias no corrosivas (NC), y que EpiSkin™ podría utilizarse, además, para apoyar la subcategorización de las sustancias corrosivas (13) (14) (15). Otros dos modelos EHR de ensayo de la corrosión cutánea *in vitro*, disponibles en el mercado, han dado resultados similares al MRV de EpiDerm™ de acuerdo con una validación basada en normas de comportamiento (16) (17) (18). Se trata de SkinEthic™ RHE¹ y de epiCS® (anteriormente denominado EST-1000) que también pueden utilizarse con fines normativos para distinguir sustancias corrosivas de sustancias no corrosivas (19) (20). Unos estudios tras la validación, efectuados por los productores del modelo EHR en los años 2012 a 2014 con un protocolo perfeccionado que corrige interferencias de la reducción inespecífica del MTT por los productos problema, mejoraron el comportamiento tanto en cuanto a la discriminación de productos C/NC como en cuanto al apoyo a la subcategorización de los agentes corrosivos (21) (22). Se han llevado a cabo más análisis estadísticos de los datos obtenidos tras la validación con EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS®, con el fin de encontrar modelos predictivos alternativos que mejoren la capacidad de asignación para la subcategorización (23).

¹ Se utiliza la abreviatura EHR (= epidermis humana reconstruida) para todos los modelos basados en la tecnología de EHR. La abreviatura inglesa RHE que se utiliza en relación con el modelo de SkinEthic™ significa lo mismo, pero, como parte del nombre de este método de ensayo específico comercializado, se deja en inglés.

5. Antes de que pueda utilizarse con fines normativos un método de ensayo EHR *in vitro* similar o modificado para evaluar la corrosión cutánea distinto de los MRV, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con los MRV, de acuerdo con los requisitos de las normas de comportamiento (24) establecidas según los principios del documento de orientación de la OCDE n.º 34 (25). La aceptación mutua de datos solo se garantizará después de que se haya revisado e incluido en las directrices de ensayo correspondientes el eventual método de ensayo nuevo o actualizado propuesto que cumpla las normas de comportamiento. Los modelos de ensayo incluidos en esas directrices de ensayo pueden utilizarse para cumplir los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos sobre el método de ensayo *in vitro* para detectar la corrosión cutánea, al tiempo que se benefician de la aceptación mutua de datos.

DEFINICIONES

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES

7. El presente método de ensayo permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP. Este método de ensayo facilita, además, la subcategorización de las sustancias y mezclas corrosivas en la subcategoría optativa 1A, de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas (1), así como una combinación de las subcategorías 1B y 1C (21) (22) (23). Una limitación de este método de ensayo es que no permite discriminar entre las subcategorías de corrosivos cutáneos 1B y la 1C, de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, debido a lo limitado del conjunto de grupos de productos corrosivos *in vivo* de la subcategoría 1C. Los modelos de ensayo EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS® permiten la subcategorización (es decir, 1A frente a 1B-y-1C y frente a NC)
8. En la validación en apoyo de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo, cuando se utilizan para la identificación de agentes no corrosivos y corrosivos, se ha analizado una amplia gama de productos químicos que representan principalmente sustancias individuales; la base de datos empíricos del estudio de validación ascendió a 60 productos que abarcaban una amplia gama de clases químicas (8) (9) (10). Los ensayos para demostrar la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la reproducibilidad intralaboratorios del ensayo para la subcategorización fueron realizados por los diseñadores del método de ensayo y sus resultados fueron revisados por la OCDE (21) (22) (23). Sobre la base del conjunto de datos disponibles, el método de ensayo es aplicable a una amplia gama de clases químicas y estados físicos, incluidos líquidos, semisólidos, sólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. En los casos en que haya pruebas de que los

modelos de ensayo incluidos en este método de ensayo no son aplicables a una categoría específica de productos problema, los modelos no deberán utilizarse con tal categoría específica de productos problema. Además, se supone que este método de ensayo es aplicable a las mezclas como una extensión de su aplicabilidad a las sustancias. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas [por ejemplo, a raíz de una estrategia como la propuesta en (26)], el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Aún no se han efectuado estudios de validación de gases y aerosoles (8) (9) (10). Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología de EHR, el actual método de ensayo no permite hacerlo.

9. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad tisular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas. El tipo de testigos adaptados que puede ser necesario varía en función del tipo de interferencia producida por el producto problema y del procedimiento utilizado para medir el formazano de MTT (véanse los puntos 25-31).
10. Aunque este método de ensayo no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 aborda específicamente el efecto sanitario de la irritación cutánea *in vitro* (5) y está basado en el mismo sistema de ensayo de EHR, aunque utiliza un protocolo distinto (5). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (6). Este enfoque IATA incluye la realización de ensayos *in vitro* de corrosión cutánea (como los descritos en el presente método) y de irritación cutánea antes de considerar las pruebas con animales vivos. Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El producto problema se aplica tópicamente a un modelo de EHR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en las capas basal, espinosa y granulosa organizadas, y en un estrato córneo con varias capas

intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos análogas a las que se encuentran *in vivo*.

12. El método de ensayo con EHR se basa en la premisa de que los productos corrosivos pueden penetrar en el estrato córneo por difusión o erosión, y son citotóxicos para las células de las capas subyacentes. La viabilidad celular se mide mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal de formazano azul que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (27). Los productos corrosivos se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales definidos (véanse los puntos 35 y 36). El método de ensayo de corrosión cutánea basado en la EHR ha demostrado su valor para la asignación de los efectos de corrosión cutánea *in vivo* evaluados en conejos según el método de ensayo B.4 (2).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

13. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los cuatro modelos de ensayo EHR validados que se ajustan al presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el cuadro 1. En caso de que se utilice un método de subclasificación, deberá demostrarse que también es correcta la subcategorización. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (24)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

Cuadro 1: Lista de sustancias para la prueba de la competencia¹

Sustancia	N.º CAS	Clase química ²	Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP sobre la	Cat. según los resultados obtenidos con MRV <i>in vitro</i> ⁴	Reductor de MTT ⁵	Estado físico
Corrosivos <i>in vivo</i> de subcategoría 1A						
Ácido bromoacético	79-08-3	Ácido orgánico	1A	(3) 1A	--	S
Trifluoruro de boro dihidratado	13319-75-0	Ácido inorgánico	1A	(3) 1A	--	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	--	S
Cloruro de dicloroacetilo	79-36-7	Electrófilo	1A	(3) 1A	--	L
Corrosivos <i>in vivo</i> de subcategorías 1B y 1C combinadas						
Ácido glioxílico monohidratado	563-96-2	Ácido orgánico	1B y 1C	(3) 1B y 1C	--	S
Ácido láctico	598-82-3	Ácido orgánico	1B y 1C	(3) 1B y 1C	--	L
Etanolamina	141-43-5	Base orgánica	1B	(3) 1B y 1C	Sí	Viscoso

Ácido clorhídrico (14,4 %)	7647-01-0	Ácido inorgánico	1B y 1C	(3) 1B y 1C	--	L
No corrosivos <i>in vivo</i>						
Bromuro de fenetilo	103-63-9	Electrófilo	NC	(3) NC	Sí	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgánica	NC	(3) NC	--	S
4-(Metiltio)-benzaldehído	3446-89-7	Electrófilo	NC	(3) NC	Sí	L
Ácido láurico	143-07-7	Ácido orgánico	NC	(3) NC	--	S

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; MRV = método de referencia validado; NC = no corrosivo

¹ Las sustancias para la prueba de la competencia, clasificadas primero entre corrosivas y no corrosivas, y después por su clase química, se seleccionaron de entre las sustancias utilizadas en los estudios de validación del ECVAM de EpiSkin™ y EpiDerm™ (8) (9) (10) y de los estudios tras la validación sobre la base de los datos proporcionados por los diseñadores de EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ y epiCS® (23). Salvo que se indique lo contrario, las sustancias se sometieron a prueba al nivel de pureza obtenido cuando se compran de una fuente comercial (8) (10). En la selección se incluyen, en la medida de lo posible, sustancias que: i) son representativas de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., sustancias no corrosivas; sustancias débilmente corrosivas a fuertemente corrosivas) que los MRV pueden medir o predecir; ii) son representativas de las clases químicas utilizadas en los estudios de validación; iii) tienen estructuras químicas bien definidas; iv) inducen resultados reproducibles en los MVR; v) inducen resultados definitivos con el método de ensayo de referencia *in vivo*; vi) están disponibles en el comercio; y vii) no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos.

² Clase química asignada por Barratt *et al.* (8).

³ Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

⁴ Las asignaciones *in vitro* obtenidas con los MRV y presentadas en este cuadro se obtuvieron con los modelos de ensayo EpiSkin™ y EpiDerm™ (MRV) durante pruebas realizadas tras la validación por los diseñadores del método de ensayo.

⁵ Los valores de viabilidad obtenidos en los estudios de validación de la corrosión cutánea del ECVAM no se corrigieron para tener en cuenta la reducción directa del MTT (en los estudios de validación no se hicieron controles con tejidos muertos). Sin embargo, los datos tras la validación generados por los diseñadores del método de ensayo que se presentan en este cuadro se obtuvieron con controles adaptados (23).

14. Como parte del ejercicio de demostración de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del fabricante del modelo de EHR. Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método de ensayo y se haya demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice sistemáticamente un método de ensayo, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

PROCEDIMIENTO

15. A continuación se describen de forma genérica los componentes y procedimientos de los modelos de ensayo de EHR para la evaluación de la corrosión cutánea objeto del presente

método de ensayo. Los modelos de EHR aprobados para usarse en este método de ensayo, es decir, los modelos EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE y epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales. Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) de estos cuatro modelos de EHR están disponibles (34) (35) (36) (37), y los principales componentes de su método de ensayo se resumen en el apéndice 2. Se recomienda consultar el PNT correspondiente a la hora de aplicar y utilizar uno de estos modelos en el laboratorio. El ensayo con los cuatro modelos de ensayo EHR que corresponden al presente método de ensayo debe cumplir las condiciones siguientes:

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO EHR

Condiciones generales

16. Para reconstruir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos no transformados. Bajo un estrato córneo funcional, deben encontrarse varias capas de células epiteliales viables (estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso). El estrato córneo debe constar de varias capas con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de los productos citotóxicos de referencia como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (DSS) o tritón X-100. La existencia de la función de barrera debe demostrarse, y puede evaluarse determinando la concentración a la que el producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI₅₀) tras un tiempo fijo de exposición, o bien determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % (TE₅₀) tras la aplicación del producto de referencia a una concentración fija especificada (véase el punto 18). Las propiedades de aislamiento del modelo de EHR deben evitar que pase material del estrato córneo al tejido viable, lo que reduciría la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de EHR debe estar exento de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas u hongos.

Condiciones funcionales

Viabilidad

17. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad tisular es el ensayo de MTT (27). Las células viables de la construcción tisular de EHR reducen el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente baja, es decir, $DO < 0,1$. El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (38). Los usuarios del modelo de EHR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos. En el cuadro 2 figuran los intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos correspondientes a los cuatro modelos de ensayo de EHR validados que se incluyen en el presente método de ensayo. Como

criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar las bandas de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la DO) durante todo el tiempo de exposición.

Cuadro 2: Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO del testigo negativo para controlar la calidad del lote

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Función de barrera

18. El estrato córneo y su composición lipídica deben ser suficientes para impedir la penetración rápida de determinados productos citotóxicos de referencia (por ejemplo, DSS o tritón X-100), evaluada mediante la CI_{50} o el TE_{50} (véase el cuadro 3). La función de barrera de cada modelo de EHR utilizado debe estar demostrada por el diseñador o vendedor del modelo de EHR en el momento del suministro de los tejidos al usuario final (véase el punto 21).

Morfología

19. Debe realizarse un examen histológico del modelo de EHR que demuestre una estructura de varias capas similar a la epidermis humana, con estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo, y con un perfil lipídico similar al perfil lipídico de la epidermis humana. El diseñador o vendedor del modelo de EHR debe aportar, en el momento del suministro de los tejidos al usuario final, un examen histológico de cada lote del modelo de EHR utilizado en el que se demuestre la morfología adecuada de los tejidos (véase el punto 21).

Reproducibilidad

20. Los usuarios del método de ensayo deben demostrar la reproducibilidad de este a lo largo del tiempo con testigos positivos y negativos. Además, el método de ensayo solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor del modelo de EHR proporciona datos que demuestran la reproducibilidad a lo largo del tiempo con productos corrosivos y no corrosivos de, por ejemplo, la lista de sustancias para la prueba de la competencia (cuadro 1). En caso de que se utilice un método de ensayo para la subcategorización, también debe demostrarse la reproducibilidad respecto a esta.

Control de calidad (CC)

21. El modelo de EHR solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote del modelo utilizado cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 17), a la función de barrera (punto 18) y a la morfología (punto 19). Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método de ensayo, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. Para conseguir una asignación fiable de la clasificación en cuanto al efecto corrosivo, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con lotes de tejidos aprobados en el CC. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de CI_{50} o TE_{50} . En el cuadro 3 figuran los intervalos de aceptabilidad de los cuatro modelos de ensayo validados.

Cuadro 3: Criterios de control de calidad para la aprobación de los lotes

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (33).	$CI_{50} = 1,0$ mg/ml	$CI_{50} = 3,0$ mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Tritón X-100 al 1 %) (34)	$TE_{50} = 4,0$ horas	$TE_{50} = 8,7$ horas
SkinEthic™ RHE (Tritón X-100 al 1 %) (35)	$TE_{50} = 4,0$ horas	$TE_{50} = 10,0$ horas
epiCS® (Tritón X-100 al 1 %) (36)	$TE_{50} = 2,0$ horas	$TE_{50} = 7,0$ horas

Aplicación de los productos problema y testigo

22. Deben utilizarse al menos dos réplicas tisulares con cada producto problema y testigos con cada tiempo de exposición. En caso de productos líquidos, así como sólidos, debe aplicarse una cantidad de producto problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, un mínimo de $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ o $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Según los modelos, antes de aplicar productos sólidos debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con el producto problema (34) (35) (36) (37). Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. El método de aplicación debe ser adecuado para el producto problema (véanse, por ejemplo, las referencias 34-37). Al final del período de exposición, el producto problema debe retirarse cuidadosamente de la epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o una solución de NaCl al 0,9 %. Dependiendo de cuál de los cuatro modelos de ensayo de EHR se utilice, se utilizarán dos o tres períodos de exposición por producto problema (para los cuatro modelos de EHR válidos: 3 min y 1 hora; en el caso de EpiSkin™, un tiempo de exposición adicional de 4 horas). En función del modelo de ensayo de

EHR utilizado y del período de exposición evaluado, la temperatura de incubación durante la exposición puede variar entre la temperatura ambiente y 37 °C.

23. Deben utilizarse en cada tanda testigos negativos y positivos (TP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con los testigos negativos), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con los TP) de los tejidos se encuentran dentro de una banda de aceptación histórica definida. Según el modelo de EHR utilizado, los productos TP que se proponen son ácido acético glacial o KOH 8 N. Cabe señalar que la KOH 8 N es un reductor directo del MTT que puede requerir controles adaptados, tal como se describe en los puntos 25 y 26. Las sustancias testigo negativo que se proponen son NaCl al 0,9 % o agua.

Medición de la viabilidad celular

24. El ensayo del MTT, que es un ensayo cuantitativo, debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente método de ensayo (27). La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (0,3 o 1 mg/ml) durante 3 horas. A continuación, el producto de formazano azul precipitado se extrae del tejido utilizando un disolvente (p. ej., isopropanol, isopropanol ácido), y la concentración de formazano se mide determinando la DO a 570 nm con un paso de banda máximo de ± 30 nm, o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (véanse los puntos 30 y 31) (38).
25. Ciertos productos problema pueden interferir con el ensayo del MTT, mediante una reducción directa del MTT a formazano azul, y/o mediante interferencia de color si el producto problema absorbe, de forma natural o debido a los procedimientos del tratamiento, en la misma gama de DO que el formazano (570 ± 30 nm, principalmente productos químicos de color azul y violeta). Deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir una posible interferencia con estos productos problema, como el control de reducción inespecífica del MTT (NSMTT) y el control del color inespecífico (NSC) (véanse los puntos 26 a 30). Esto es especialmente importante cuando un producto problema específico no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis, y está presente, por tanto, en los tejidos cuando se realiza la prueba de viabilidad del MTT. En los PNT correspondientes a los modelos de ensayo puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (34) (35) (36) (37).
26. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a un medio de MTT recién preparado (34) (35) (36) (37). Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe efectuarse otro control funcional con epidermis inviable, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben el producto problema en cantidad similar a los tejidos viables. Cada producto que reduce el MTT se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto por cada tiempo de exposición, que se someten al ensayo

completo de corrosión cutánea. La viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT).

27. Para detectar la posible interferencia debida a productos problema coloreados o que se colorean cuando se ponen en contacto con el agua o el isopropanol y decidir sobre si es necesario efectuar más controles, debe llevarse a cabo un análisis espectral del producto problema en agua (entorno durante la exposición) y/o en isopropanol (solución de extracción). Si el producto problema en agua o isopropanol absorbe luz en el intervalo de 570 ± 30 nm, deben llevarse a cabo otros controles del colorante o, como alternativa, debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso estos controles no son necesarios (véanse los puntos 30 y 31). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema coloreado que interfiere se aplica en al menos dos réplicas de tejido viable por tiempo de exposición, que se someten al ensayo completo de corrosión cutánea, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un control de color inespecífico (NSC_{vivo}). El control NSC_{vivo} debe realizarse en paralelo en cada tiempo de exposición y con cada producto problema coloreado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con una solución de MTT menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, efectuado todo al mismo tiempo que el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{vivo}).
28. Los productos problema que se identifican como causantes tanto de reducción directa del MTT (véase el punto 26) como de interferencia de color (véase el punto 27) también requerirán un tercer conjunto de controles, aparte de los controles NSMTT y NSC_{vivo} que se describen en los puntos anteriores, cuando se lleva a cabo la medición normal de la absorbancia (DO). Esto es generalmente así en el caso de los productos problema de color oscuro que interfieren con el ensayo del MTT (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 26. Estos productos problema pueden unirse tanto a los tejidos vivos como a los muertos y, por tanto, el control NSMTT puede facilitar la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también de la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección por la interferencia de color, puesto que el NSC_{vivo} ya corrige la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección por la interferencia de color, es necesario realizar un tercer control del color inespecífico con tejidos muertos (NSC_{muerto}). En este testigo adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto por cada tiempo de exposición, que se someten a todo el

procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo testigo de NSC_{muerto} es suficiente por producto problema cualquiera que sea el número de ensayos o tandas independientes realizados, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control de NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el % NSMTT menos el % NSC_{vivo} más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculado en relación con el control negativo que se lleva a cabo en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{muerto}).

29. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar las lecturas del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, cada laboratorio debe determinar el intervalo de linealidad de su espectrofotómetro con formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7) procedente de una fuente comercial antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos. En particular, la medición normal de la absorbancia (DO) mediante el uso de un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los productos problema que son reductores directos del MTT y los que interfieren con el color, cuando las DO de los extractos tisulares obtenidas con el producto problema sin ninguna corrección por la reducción directa del MTT o la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro o cuando la viabilidad porcentual sin corregir obtenida con el producto problema ya lo ha definido como corrosivo (véanse los puntos 35 y 36). No obstante, deben tomarse con precaución los resultados de los productos problema que muestran un % NSMTT o un % NSC_{vivo} > 50 % del testigo negativo.
30. En el caso de los productos problema coloreados que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia (DO) debido a una interferencia demasiado fuerte con el ensayo del MTT, puede emplearse el procedimiento alternativo de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véase el punto 31) (37). El sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (38). Por esta razón, los controles NSC_{vivo} o NSC_{muerto} no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse los controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT o tiene un color que obstaculiza la evaluación de la capacidad de reducir directamente el MTT (tal como se describe en el punto 26). Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de los productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de la viabilidad tisular obtenida con los tejidos vivos expuestos al producto problema

menos el porcentaje de NSMTT. Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse los reductores directos de MTT que también pueden interferir con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (con medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (con espectrofotometría con UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.

31. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse también para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (38). Debido a la diversidad de sistemas de espectrofotometría con HPLC/UPLC, antes de utilizar uno de estos sistemas para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (38)(39). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 4. Una vez se hayan cumplido los criterios de aceptación definidos en el apéndice 4, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

Criterios de aceptabilidad

32. Con cada método de ensayo que utilice modelos de EHR válidos, los tejidos tratados con el testigo negativo deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos, tal como se describe en el cuadro 2, y no deben estar por debajo de los límites establecidos según los datos históricos. Los tejidos tratados con el TP, a saber, ácido acético glacial o KOH 8 N, deben reflejar la capacidad de los tejidos de responder a un producto corrosivo en las condiciones del modelo de ensayo (véase el apéndice 2). La variabilidad entre las réplicas tisulares de los productos problema y/o productos testigo debe estar dentro de los límites aceptados en relación con los requisitos de cada modelo de EHR válido (véase el apéndice 2) (p. ej., la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %). Si el testigo negativo o el TP incluido en una tanda queda fuera de los intervalos aceptados, se considera que la tanda no es apta y debe repetirse. Si la variabilidad de los productos problema está fuera del intervalo definido, deben repetirse sus ensayos.

Interpretación de los resultados y modelo de asignación

33. Los valores de DO obtenidos con cada producto problema deben utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad respecto al testigo negativo, que se fija arbitrariamente en el 100 %. Si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. El porcentaje umbral de viabilidad celular que permite distinguir

los productos problema corrosivos de los no corrosivos (o discriminar entre distintas subcategorías de corrosivos) se define en los puntos 35 y 36 para cada uno de los modelos de ensayo cubiertos por el presente método de ensayo y debe utilizarse para interpretar los resultados.

34. Una sola tanda de ensayos, formada al menos por dos réplicas tisulares, debería ser suficiente para un producto problema, si la clasificación resultante es clara. Sin embargo, en caso de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.
35. En el cuadro 4 se recoge el modelo de asignación del modelo de ensayo de corrosión cutánea EpiSkin™ (9) (34) (22), asociado al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

Cuadro 4: Modelo de asignación EpiSkin™

Viabilidad medida tras los tiempos de exposición (t = 3, 60 y 240 minutos)	Asignación que debe considerarse
< 35 % tras 3 min de exposición	Corrosivo: • Subcategoría optativa 1A*
> 35 % tras 3 min de exposición Y < 35 % tras 60 min de exposición O ≥ 35 % tras 60 min de exposición Y < 35 % tras 240 min de exposición	Corrosivo: • Combinación de las subcategorías optativas 1B y 1C
≥ 35 % tras 240 min de exposición	No corrosivo

*) Según los datos obtenidos con el fin de evaluar la utilidad de los modelos de ensayo de EHR para apoyar la subcategorización, se ha demostrado que en torno al 22 % de los resultados de la subcategoría 1A del modelo de ensayo EpiSkin™ pueden corresponder en realidad a sustancias/mezclas de subcategoría 1B o subcategoría 1C (es decir, sobreclasificación) (véase el apéndice 3).

36. En el cuadro 5 se muestran los modelos de asignación de los modelos de ensayo de corrosión cutánea EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36), y epiCS® (16) (23) (37), asociados al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y el CLP.

Cuadro 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS®

Viabilidad medida tras los tiempos de exposición (t = 3, y 60 minutos)	Asignación que debe considerarse
ETAPA 1 con EpiDerm™ SCT, con SkinEthic™ RHE y epiCS®	
< 50 % tras 3 min de exposición	Corrosivo

≥ 50 % tras 3 min de exposición Y < 15 % tras 60 min de exposición	Corrosivo
≥ 50 % tras 3 min de exposición Y ≥ 15 % tras 60 min de exposición	No corrosivo
ETAPA 2 con EpiDerm™ SCT, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1	
< 25 % tras 3 min de exposición	Subcategoría optativa 1A*
≥ 25 % tras 3 min de exposición	Combinación de las subcategorías optativas
ETAPA 2 con SkinEthic™ RHE, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1	
< 18 % tras 3 min de exposición	Subcategoría optativa 1A*
≥ 18 % tras 3 min de exposición	Combinación de las subcategorías optativas
ETAPA 2 con epiCS®, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1	
< 15 % tras 3 min de exposición	Subcategoría optativa 1A*
≥ 15 % tras 3 min de exposición	Combinación de las subcategorías optativas

DATOS E INFORME

Datos

37. Respecto a cada ensayo, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas tisulares (p. ej., los valores de DO y los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada producto problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben comunicarse las medias e intervalos de viabilidad y coeficientes de variación entre las réplicas tisulares de cada ensayo. Con respecto a cada producto estudiado, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT por tratarse de productos reductores directos del MTT o estar coloreados.

Informe del ensayo

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

Productos problema y testigo:

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;
- Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

- Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- Origen; número de lote, si está disponible;
- Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;
- Condiciones de conservación.

Modelo de EHR y protocolo utilizados y justificación (si procede)

Condiciones de ensayo:

- Modelo de EHR utilizado (incluido el número de lote);
- Información sobre la calibración del dispositivo de medición (por ejemplo, espectrofotómetro), la longitud de onda y el paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición;
- Descripción del método utilizado para cuantificar el MTT de formazano;
- Descripción de la aptitud del sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede;
- Información justificativa completa sobre el modelo de EHR concreto utilizado, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:
 - i) Viabilidad;
 - ii) Función de barrera;
 - iii) Morfología;
 - iv) Reproducibilidad y capacidad de asignación;
 - v) Controles de calidad (CC) del modelo;
- Referencia a datos históricos del modelo. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:
- Aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a datos anteriores del lote;
- Demostración de la competencia para la realización del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

Procedimiento de ensayo:

- Detalles del procedimiento de ensayo utilizado (incluidos los procedimientos de lavado utilizados tras el período de exposición);
- Dosis del producto problema y de los productos testigo utilizados;
- Duración del período o períodos de exposición y temperatura o temperaturas de exposición;

- Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;
- Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (TP, testigo negativo, NSMTT, NSC_{vivo} y NSC_{muerto}, en su caso) por tiempo de exposición;
- Descripción de los criterios de decisión / modelo de asignación aplicados sobre la base del modelo de EHR utilizado;
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo (incluidos los procedimientos de lavado).

Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo:

- Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

Resultados:

- Cuadros de datos de las mediciones con cada producto problema y testigo, cada período de exposición, cada tanda y cada réplica, incluidas la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular, las diferencias entre las réplicas, las desviaciones típicas y/o los coeficientes de variación, si procede;
- En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o colorantes, incluida la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % NSC_{vivo}, el % NSC_{muerto}, diferencias en las réplicas tisulares, desviaciones típicas o coeficientes de variación (en su caso) y porcentaje final correcto de viabilidad tisular;
- Resultados obtenidos con el producto o productos problema y productos testigo en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;
- Descripción de otros efectos observados;
- Clasificación derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA) Quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html
- (2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.
- (3) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*:
- (4) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.
- (5) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida.
- (6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.

- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (15) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- (20) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.
- (21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and

Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

- (22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211 - 225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (25).

Viabilidad celular: Parámetro que mide la actividad total de una población celular como, por ejemplo, la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo], que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células vivas.

Producto: Sustancia o mezcla.

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “exactitud” se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (25).

TE₅₀: Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración del producto de referencia a una concentración fija determinada; véase también CI₅₀.

SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos): Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (1).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IATA: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

CI₅₀: Puede estimarse determinando la concentración a la que un producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI₅₀) tras un tiempo fijo de exposición; véase también TE₅₀.

Dosis excesiva: Cantidad de producto problema aplicada a la epidermis que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie de la epidermis.

Mezcla: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias en la cual no reaccionan.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $> 10\%$ (p/p) y $< 80\%$ (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

NC: No corrosivo.

Control NSC_{muerto}: Control de color inespecífico en tejidos muertos.

Control NSC_{vivo}: Control de color inespecífico en tejidos vivos.

NSMTT: Reducción inespecífica del MTT.

DO: Densidad óptica.

TP: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (25).

Pertinencia: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (25).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (25).

Tanda: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un TP.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (25).

Corrosión cutánea *in vivo*: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y, al cabo de 14 días de observación, cambio de coloración por palidez de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

Especificidad: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (25).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UPLC: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

Apéndice 2

PRINCIPALES ELEMENTOS DE LOS MODELOS DE ENSAYO EHR VALIDADOS PARA LOS ENSAYOS DE CORROSIÓN CUTÁNEA

Componentes del modelo de ensayo	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Superficie del modelo	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Número de réplicas tisulares	Mínimo de 2 por tiempo de exposición	2-3 por tiempo de exposición	Mínimo de 2 por tiempo de exposición	Mínimo de 2 por tiempo de exposición
Dosis de tratamiento y aplicación	<u>Productos líquidos y viscosos</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Productos sólidos</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl de solución de NaCl (9 g/l) <u>Productos céreos/viscosos</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) con malla de nailon	<u>Productos líquidos</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) con malla de nailon o sin ella <i>Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.</i> <u>Productos semisólidos</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Productos sólidos</u>: 25 µl H₂O (o más en caso necesario) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Productos céreos</u>: Disco plano de unos 8 mm de diámetro puesto sobre el tejido humedecido con 15 µl H₂O.	<u>Productos líquidos y viscosos</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) con malla de nailon <i>Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.</i> <u>Productos sólidos</u>: 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Productos céreos/viscosos</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) con malla de nailon	<u>Productos líquidos</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) con malla de nailon <i>Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.</i> <u>Productos semisólidos</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Productos sólidos</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (o más en caso necesario) <u>Productos céreos</u>: Disco plano de unos 8 mm de diámetro puesto sobre el tejido humedecido con 15 µl H₂O.

Componentes del modelo de ensayo	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Control previo en relación con la reducción directa del MTT	50 µl (líquidos) o 20 mg (sólidos) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml de solución durante 180 ± 5 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua.	50 µl (líquidos) o 25 mg (sólidos) + 1 ml MTT 1 mg/ml de solución durante 60 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación.	40 µl (líquidos) o 20 mg (sólidos) + 1 ml MTT 1 mg/ml de solución durante 180 ± 15 min a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación.	50 µl (líquidos) o 25 mg (sólidos) + 1 ml MTT 1 mg/ml de solución durante 60 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación.
Control previo en relación con la interferencia de color	10 µl (líquido) o 10 mg (sólido) + 90 µl de H₂O mezclados durante 15 minutos a temperatura ambiente → Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	50 µl (líquido) o 25 mg (sólido) + 300 µl de H₂O Durante 60 min a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	40 µl (líquido) o 20 mg (sólido) + 300 µl de H₂O mezclados durante 60 minutos a temperatura ambiente → Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	50 µl (líquido) o 25 mg (sólido) + 300 µl de H₂O Durante 60 min a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa → Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.
Tiempo de exposición y temperatura	3 min, 60 min (± 5 min) y 240 min (± 10 min) En armario ventilado A temperatura ambiente (18-28 °C)	3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa	3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa	3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37 °C, 5 % CO₂, 95 % de humedad relativa

Componentes del modelo de ensayo	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Aclarado	25 ml 1x PBS (solución salina amortiguadora de fosfato) (2 ml/enjuague)	20 veces con un flujo constante suave de 1x PBS	20 veces con un flujo constante suave de 1 x PBS	20 veces con un flujo constante suave de 1 x PBS
Testigo negativo	50 µl de solución de NaCl (9 g/l) Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición	50 µl de H ₂ O Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición	40 µl de H ₂ O Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición	50 µl de H ₂ O Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición
Testigo positivo	50 µl de ácido acético glacial Sometido al ensayo solo durante 4 horas	50 µl de KOH 8 N Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición	40 µl de KOH 8 N Sometido al ensayo solo durante 1 hora	50 µl de KOH 8 N Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición
Solución de MTT	2 ml de solución con 0,3 mg/ml	300 µl de solución con 1 mg/ml	300 µl de solución con 1 mg/ml	300 µl de solución con 1 mg/ml
Tiempo y temperatura de incubación del MTT	180 min (±15 min) a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % de humedad relativa	180 min a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % de humedad relativa	180 min (± 15 min) a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % de humedad relativa	180 min a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % de humedad relativa
Disolvente de extracción	500 µl de isopropanol acidificado (HCl 0,04 N en isopropanol) (tejido aislado en inmersión total)	2 ml de isopropanol (extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza)	1,5 ml de isopropanol (extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza)	2 ml de isopropanol (extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza)

Componentes del modelo de ensayo	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Tiempo y temperatura de extracción	Una noche a temperatura ambiente, protegido de la luz	Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente	Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente	Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente
Lectura de la DO	570 nm (545 - 595 nm) sin filtro de referencia	570 nm (o 540 nm) sin filtro de referencia	570 nm (540 - 600 nm) sin filtro de referencia	540 - 570 nm sin filtro de referencia
Control de calidad del tejido	18 horas de tratamiento con DSS $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{CI}_{50} \leq 3,0 \text{ mg/ml}$	Tratamiento con 1 % de tritón X-100 4,08 horas $\leq \text{TE}_{50} \leq 8,7$ horas	Tratamiento con 1 % de tritón X-100 4,0 horas $\leq \text{TE}_{50} \leq 10,0$ horas	Tratamiento con 1 % de tritón X-100 2,0 horas $\leq \text{TE}_{50} \leq 7,0$ horas
Criterios de aceptabilidad	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo (NaCl) debe ser $\geq 0,6$ y $\leq 1,5$ con cada tiempo de exposición. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 4 horas con el testigo positivo (ácido acético glacial), expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 20 %. 3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con $\text{DO} \geq 0,3$, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %.	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo (H_2O) debe ser $\geq 0,8$ y $\leq 2,8$ con cada tiempo de exposición. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 15 %. 3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad, el coeficiente de variación (CV) entre las réplicas tisulares debe ser ≤ 30 %	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo (H_2O) debe ser $\geq 0,8$ y $\leq 3,0$ con cada tiempo de exposición. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora (y 4 horas, en su caso) con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 15 %. 3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con $\text{DO} \geq 0,3$, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %.	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo (H_2O) debe ser $\geq 0,8$ y $\leq 2,8$ con cada tiempo de exposición. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 20 %. 3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con $\text{DO} \geq 0,3$, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %.

Apéndice 3

COMPORTAMIENTO DE LOS MODELOS DE ENSAYO RESPECTO A LA SUBCATEGORIZACIÓN

El cuadro que figura a continuación recoge el comportamiento de los cuatro modelos de ensayo calculado sobre la base de un conjunto de 80 productos químicos probados por los cuatro diseñadores de los ensayos. La Secretaría de la OCDE realizó los cálculos, que fueron revisados y aprobados por un subgrupo de expertos (21) (23).

Los modelos de ensayo EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ y epiCS® permiten la subcategorización (es decir, 1A frente a 1B-y-1C y frente a NC).

Comportamientos, índices de sobreclasificación, índices de subclasificación y exactitud (capacidad de asignación) de los cuatro modelos de ensayo basados en un conjunto de 80 productos químicos sometidos todos ellos a ensayo durante 2 o 3 tandas en cada modelo de ensayo:

ESTADÍSTICAS SOBRE LAS ASIGNACIONES OBTENIDAS CON TODO EL CONJUNTO DE PRODUCTOS				
(n = 80 productos sometidos a ensayo en 2 tandas independientes en el caso de epiCS® o 3 tandas independientes en el de EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ y SkinEthic™ RHE, es decir, respectivamente 159* o 240 clasificaciones)				
* Un producto se sometió a ensayo una vez en relación con epiCS® por falta de disponibilidad (23).				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Sobreclasificaciones:				
1B-1C sobreclasificados como 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC sobreclasificados como 1B y 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC sobreclasificados como 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Sobreclasificados como Corr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Índice de sobreclasificación global (todas las categorías)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Subclasificaciones:				
1A subclasificados como 1B y 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A subclasificados como NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B y 1C subclasificados como NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Índice de subclasificación global (todas las categorías)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %

Clasificaciones correctas:				
1A correctamente clasificados	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B y 1C correctamente clasificados	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC correctamente clasificados	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Exactitud general	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: No corrosivo.

Apéndice 4

Parámetros clave y criterios de aceptación para considerar apto un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para la medición del formazano de MTT extraído del tejido de EHR

Parámetro	Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (37) (38)	Criterios de aceptación
Selectividad	Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de tejidos vivos de EHR sin tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de tejidos muertos de EHR sin tratamiento)	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}^1$
Precisión	Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Exactitud	Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Efecto de matriz	Controles de calidad con blanco vivo (n = 5)	$85 \% \leq \text{efecto de matriz} \leq 115 \%$
Efecto residual	Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC ²	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}$
Reproducibilidad (intradía)	Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml); Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	Curvas de calibración: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$ Controles de calidad: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ y } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducibilidad (interdiaria)	Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)	
Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$
Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR, en caso necesario	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a la temperatura especificada (p.ej., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$

¹LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.

²LSC: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos, es decir, 200 µg/ml.».

7) En la parte B, el capítulo B.46 se sustituye por el texto siguiente:

«B.46. IRRITACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 439 de la OCDE (2015). La irritación cutánea se refiere a la producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos] (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹. El presente método de ensayo proporciona un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse para identificar el peligro que suponen los productos (sustancias y mezclas) irritantes según la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (2). En las regiones que no adoptan la categoría 3 optativa del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves), este método de ensayo puede utilizarse también para identificar productos no clasificados. Por lo tanto, dependiendo del marco normativo y del sistema de clasificación empleado, este método de ensayo puede utilizarse para determinar la capacidad de irritación cutánea de los productos, ya sea como ensayo de sustitución independiente del ensayo de irritación cutánea *in vivo* o como ensayo de sustitución parcial dentro de una estrategia de ensayo (3).
2. La evaluación de la irritación cutánea suele implicar el uso de animales de laboratorio (método B.4, equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE, adoptadas originalmente en 1981 y revisadas en 1992, 2002 y 2015) (4). En el caso de la prueba de corrosividad, se han adoptado tres métodos de ensayo *in vitro* validados como método de ensayo B.40 de la UE (equivalente a las directrices de ensayo TG 430 de la OCDE), método de ensayo B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayo TG 431 de la OCDE) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (5) (6) (7). Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.008, p. 1).

como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (3).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en el sistema de ensayo *in vitro* de epidermis humana reconstruida (EHR), que imita bien las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las partes superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. El sistema de ensayo de EHR utiliza queratinocitos no transformados, obtenidos de seres humanos, como fuente de células para reconstruir un modelo de epidermis con histología y citoarquitectura representativas. Se dispone de normas de comportamiento para facilitar la validación y evaluación de métodos de ensayo basados en el RHE similares y modificados, de conformidad con los principios del documento de orientación n.º 34 de la OCDE (8) (9). Las directrices de ensayo correspondientes se adoptaron originalmente en 2010, se actualizaron en 2013 para incluir modelos adicionales de EHR, y se actualizaron de nuevo en 2015 para hacer referencia al documento de orientación sobre los IATA e introducir el uso de un procedimiento alternativo de medición de la viabilidad.
4. Se han completado estudios de prevalidación, optimización y validación de cuatro modelos de ensayo *in vitro* disponibles en el mercado (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) sobre la base del sistema de ensayo de EHR (sensibilidad del 80 %, especificidad del 70 %, y exactitud del 75 %). Estos cuatro modelos de ensayo están incluidos en dichos métodos de ensayo y se enumeran en el apéndice 2, que también proporciona información sobre el tipo de estudio de validación utilizado para validar los respectivos métodos de ensayo. Como se indica en el apéndice 2, el método de referencia validado (MRV) se ha utilizado para desarrollar el presente método de ensayo y las normas de comportamiento (8).
5. Solo se garantizará la aceptación mutua de datos de la OCDE en relación con los modelos de ensayo validados con arreglo a las normas de comportamiento (8) si estos modelos de ensayo han sido revisados y adoptados por la OCDE. Los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo y las correspondientes directrices de ensayo de la OCDE pueden utilizarse indistintamente para cumplir los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos obtenidos con los métodos de ensayo *in vitro* para detectar la irritación cutánea, al tiempo que disfrutan de la aceptación mutua de datos.
6. En el apéndice 1 se dan las definiciones de los términos utilizados en el presente documento.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Una limitación del método de ensayo, demostrada por el estudio prospectivo completo de validación para la evaluación y caracterización de los métodos de ensayo con EHR (16), es que no permite la clasificación de productos en la categoría optativa 3 del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves) (1). Por tanto, el marco normativo aplicable en los Estados miembros determinará la forma de utilizar el presente método de ensayo. En el caso de la UE, la categoría 3 no se ha incluido en el Reglamento CLP. Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (3). Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.
8. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Aunque el presente método de ensayo no aporta información adecuada sobre la corrosión cutánea, ha de observarse que el método B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayo TG 431 de la OCDE) sobre corrosión cutánea se basa en el mismo sistema de ensayo con EHR, si bien utilizando un protocolo distinto (6). El presente método se basa en modelos de EHR que utilizan queratinocitos humanos, los cuales, por lo tanto, representan *in vitro* el órgano diana de la especie de interés. Además, cubre directamente la fase inicial de la cascada inflamatoria o mecanismo de acción (el daño celular y tisular que acaba en un traumatismo localizado) que sucede durante la irritación *in vivo*. Durante la validación del presente método se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos, y la base de datos del estudio de validación contaba con 58 productos en total (16) (18) (23). El método de ensayo es aplicable a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. Aún no se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles (29). Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología de EHR, el actual método de ensayo no permite hacerlo.
9. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas (por ejemplo, a raíz de una estrategia como la propuesta en Eskes *et al.*, 2012) (30), el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Debe prestarse una atención similar en el caso de que

se encuentren clases químicas o propiedades fisicoquímicas específicas que no sean aplicables al método de ensayo actual.

10. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad celular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas (véanse los puntos 28-34).
11. Una sola tanda de ensayos, formada por tres réplicas del tejido, debería ser suficiente para una sustancia problema, si la clasificación es clara. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de un porcentaje de viabilidad media igual al $50 \pm 5 \%$, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. El producto problema se aplica tópicamente a un modelo de EHR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en los estratos basal, espinoso y granuloso organizados, y en un estrato córneo con varias capas intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos análogas a las que se encuentran *in vivo*.
13. La irritación cutánea inducida por un producto, que se manifiesta fundamentalmente con eritema y edema, es el resultado de una cascada de acontecimientos que comienzan con la penetración del producto a través del estrato córneo, donde pueden dañar las capas subyacentes de queratinocitos y otras células de la piel. Las células dañadas pueden liberar mediadores de la inflamación o inducir una cascada inflamatoria, que también actúa sobre las células de la dermis, en particular las células del estroma o del endotelio de los vasos sanguíneos. La dilatación y el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales son los factores que producen el eritema y el edema observados (29). En particular, los métodos de ensayo basados en la EHR, dada la falta de vascularización en el sistema de ensayo *in vitro*, miden los sucesos que inician la cascada, por ejemplo el daño de células y tejidos (16) (17), utilizando la viabilidad celular como indicador.
14. La viabilidad celular se mide en los modelos de EHR mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal de formazano azul que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (31). Los productos irritantes se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales

definidos (es decir, $\leq 50\%$, en el caso los de irritantes de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). En función del marco normativo y de la aplicabilidad del método de ensayo, los productos problema que producen viabilidades celulares por encima del nivel umbral definido pueden considerarse no irritantes (es decir, $> 50\%$, sin categoría).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

15. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los cuatro modelos de ensayo validados que se ajustan al presente método de ensayo (apéndice 2), los laboratorios deben demostrar su competencia técnica utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el cuadro 1. En situaciones en que, por ejemplo, no esté disponible una sustancia de la lista, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (8)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1. Debe justificarse el uso de una sustancia alternativa para la prueba de la competencia.
16. Como parte del ejercicio de demostración de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del fabricante del modelo de EHR. Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método de ensayo y se haya adquirido y demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice regularmente un método de ensayo, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

Cuadro 1: Sustancias para la prueba de la competencia¹

Sustancia	N.º CAS	Puntuación <i>in vivo</i> ²	Estado físico	Categoría del SGA de las Naciones Unidas
SUSTANCIAS NO CLASIFICADAS (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas)				
Ácido naftaleno-acético	86-87-3	0	Sólido	Sin categoría
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Sin categoría
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Sin categoría
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Sin categoría (Categoría optativa 3) ³
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Sin categoría (Categoría optativa 3) ³
SUSTANCIAS CLASIFICADAS (Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas)				
Aldehído ciclámico	103-95-7	2,3	Líquido	Cat. 2
1-Bromohexano	111-25-1	2,7	Líquido	Cat. 2

Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Líquido	Cat. 2

¹ Las sustancias para la prueba de la competencia son un subconjunto de las sustancias utilizadas en el estudio de validación y la selección se basa en los siguientes criterios: i) las sustancias están disponibles en el comercio; ii) son representativas de toda la gama de resultados de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes); iii) tienen una estructura química bien definida; iv) son representativas de la funcionalidad química utilizada en el proceso de validación; v) han facilitado resultados *in vitro* reproducibles en varios ensayos y en varios laboratorios; vi) se han predecido *in vitro* correctamente, y vii) no están asociadas con un perfil extremadamente tóxico (por ejemplo, carcinogénesis o toxicidad para el sistema reproductor) y no están asociados con unos costes de eliminación prohibitivos.

² Puntuación *in vivo* de acuerdo con el método de ensayo B.4 (4).

³ Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves) (1) se considera como sin categoría.

PROCEDIMIENTO

17. A continuación se describen los componentes y procedimientos de un método de ensayo con EHR para la evaluación de la irritación cutánea (véanse también en el apéndice 3 los parámetros relacionados con cada modelo de ensayo). Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para los cuatro modelos que se ajustan al presente método de ensayo (32) (33) (34) (35).

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO EHR

Condiciones generales

18. Para reconstruir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos no transformados. Bajo un estrato córneo funcional, deben encontrarse varias capas de células epiteliales viables (estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso). El estrato córneo debe constar de varias capas con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de productos citotóxicos de referencia como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (DSS) o tritón X-100. La existencia de la función de barrera debe demostrarse, y puede evaluarse determinando la concentración a la que el producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI₅₀) tras un tiempo fijo de exposición, o bien determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % (TE₅₀) tras la aplicación del producto de referencia a una concentración fija especificada. Las propiedades de aislamiento del modelo de EHR deben evitar que pase material del estrato córneo al tejido viable, lo que reduciría la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de EHR debe estar exento de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas u hongos.

Condiciones funcionales

Viabilidad

19. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad es el ensayo de MTT (31). Las células viables de la construcción tisular de EHR pueden reducir el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente baja, es decir, $DO < 0,1$. El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (36). Los usuarios del modelo de EHR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos (en las condiciones del método de ensayo de irritación cutánea). En el cuadro 2 figuran los intervalos de aceptabilidad correspondientes a los cuatro modelos de ensayo de EHR validados que se incluyen en el presente método de ensayo. Como criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar los intervalos de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad) durante todo el tiempo de exposición del ensayo.

Cuadro 2: Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO del testigo negativo de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Función de barrera

20. El estrato córneo y su composición lipídica deben ser suficientes para impedir la penetración rápida de los productos citotóxicos de referencia (por ejemplo, DSS o tritón X-100), evaluada mediante la CI_{50} o el TE_{50} (véase el cuadro 3).

Morfología

21. Debe aportarse un examen histológico del modelo de EHR que demuestre una estructura similar a la de la epidermis humana (incluido un estrato córneo de varias capas).

Reproducibilidad

22. Los resultados de los testigos positivos y negativos del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

Control de calidad (CC)

23. El modelo de EHR solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote del modelo utilizado cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 19), a la función de barrera (punto 20) y a la morfología (punto 21). Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método de ensayo, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de CI_{50} o TE_{50} . Para conseguir una asignación fiable de la clasificación en cuanto al efecto irritante, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con tejidos adecuados. En el cuadro 3 figuran los intervalos de aceptabilidad correspondientes a los cuatro modelos de ensayo validados que se incluyen en estos métodos de ensayo.

Cuadro 3: Criterios de control de calidad para la aprobación de los lotes de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (32)	$CI_{50} = 1,0$ mg/ml	$CI_{50} = 3,0$ mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (Tritón X-100 al 1 %) (33)	$TE_{50} = 4,0$ horas	$TE_{50} = 8,7$ horas
SkinEthic™ RHE (Tritón X-100 al 1 %) (34)	$TE_{50} = 4,0$ horas	$TE_{50} = 10,0$ horas
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 horas de tratamiento con DSS) (35)	$CI_{50} = 1,4$ mg/ml	$CI_{50} = 4,0$ mg/ml

Aplicación de los productos problema y testigo

24. En cada tanda deben utilizarse al menos tres réplicas con cada producto problema y cada testigo. En caso de productos líquidos, así como sólidos, debe aplicarse una cantidad de producto problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, en un intervalo de 26 a 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ o mg/cm^2 (véase el apéndice 3). En caso de productos sólidos, antes de aplicarlos debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con el producto problema. Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. En algunos casos puede utilizarse una malla de nailon como ayuda para extender el producto (véase el apéndice 3). Al final del período de exposición, el producto problema debe retirarse cuidadosamente de la superficie de la epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o una solución de NaCl al 0,9 %. En función de los modelos de ensayo de EHR utilizados, el período de exposición oscila entre los 15 y los 60 minutos, y la temperatura de incubación entre 20 y 37 °C. Estos

períodos de exposición y temperaturas se optimizan para cada método de ensayo con EHR y representan las distintas propiedades intrínsecas de los modelos de ensayo (por ejemplo, función de barrera) (véase el apéndice 3).

25. Deben utilizarse en cada tanda un testigo negativo (TN) y un testigo positivo (TP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con el testigo negativo), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con el TP) de los tejidos se encuentran dentro de un intervalo de aceptación histórico definido. Como TP se sugiere una solución acuosa de DSS al 5 %. Como TN se sugiere agua o una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS).

Medición de la viabilidad celular

26. Según el procedimiento de ensayo, es fundamental que la medición de la viabilidad no se realice inmediatamente después de la exposición al producto problema, sino después de un período de incubación del tejido lavado, en medio fresco, durante un tiempo suficiente tras el tratamiento. Este período permite tanto la recuperación de los eventuales efectos citotóxicos débiles como la aparición de efectos citotóxicos claros. Durante la optimización del ensayo de dos de los modelos de ensayo basados en la EHR subyacentes a este método de ensayo, se observó que es óptimo el período de incubación de 42 horas tras el tratamiento (11) (12) (13) (14) (15).
27. El ensayo del MTT es un método cuantitativo normalizado que debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente método de ensayo. Es compatible con el uso de una construcción tisular tridimensional. La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (p. ej., 0,3-1 mg/ml) durante 3 horas. Las células viables transforman el MTT en formazano azul. A continuación, el producto de formazano azul precipitado se extrae del tejido utilizando un disolvente (p. ej., isopropanol, isopropanol ácido), y la concentración de formazano se mide determinando la DO a 570 nm con un paso de banda máximo de ± 30 nm, o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (véase el punto 34) (36).
28. Pueden interferir con el ensayo las propiedades ópticas del producto problema o su acción química sobre el MTT (por ejemplo, ciertos productos pueden impedir o invertir la formación de color, así como causarla), lo que dará lugar a una estimación errónea de la viabilidad. Puede ocurrir así cuando un producto problema determinado no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis. Si el producto problema actúa directamente sobre el MTT (p. ej., un reductor de este), tiene color natural o se colorea durante el tratamiento del tejido, deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir la posible interferencia del producto problema con la técnica de medición de la viabilidad (véanse los puntos 29 y 33). En los procedimientos normalizados de trabajo correspondientes a los cuatro modelos validados incluidos en el presente método de ensayo puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la

reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (32) (33) (34) (35).

29. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a una solución de MTT recién preparada. Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe efectuarse otro control funcional con tejidos de EHR inviables, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben el producto problema de forma similar a los tejidos viables. Cada producto problema reductor del MTT se aplica al menos a dos réplicas de tejido muerto que se someten a todo el procedimiento de ensayo para generar una reducción inespecífica del MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un solo control NSMTT es suficiente por producto problema, independientemente del número realizado de ensayos o tandas independientes. La viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT).
30. Para detectar la posible interferencia debida a productos problema coloreados o que se colorean cuando se ponen en contacto con el agua o el isopropanol y decidir sobre si es necesario efectuar más controles, debe llevarse a cabo un análisis espectral del producto problema en agua (entorno durante la exposición) y/o en isopropanol (solución de extracción). Si el producto problema en agua o isopropanol absorbe luz en el intervalo de 570 ± 30 nm, deben llevarse a cabo otros controles del colorante o, como alternativa, debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso estos controles no son necesarios (véanse los puntos 33 y 34). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema coloreado que interfiere se aplica en al menos dos réplicas de tejido viable, que se someten al procedimiento de ensayo completo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un control de color inespecífico (NSC_{vivo}). El control NSC_{vivo} debe realizarse al mismo tiempo que los ensayos del producto problema coloreado y, en caso de ensayos múltiples, debe llevarse a cabo un control NSC_{vivo} independiente con cada ensayo realizado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con una solución de MTT menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados

con medio sin MTT, efectuado todo al mismo tiempo que el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{vivo}).

31. Los productos problema que se identifican como causantes tanto de reducción directa del MTT (véase el punto 29) como de interferencia de color (véase el punto 30) también requerirán un tercer conjunto de controles, aparte de los controles NSMTT y NSC_{vivo} que se describen en los puntos anteriores, cuando se lleva a cabo la medición normal de la absorbancia (DO). Este es generalmente así en el caso de los productos problema de color oscuro que interfieren con el ensayo del MTT (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 29. Estos productos problema pueden unirse tanto a los tejidos vivos como a los muertos y, por tanto, el control NSMTT puede facilitar la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también de la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección por la interferencia de color, puesto que el NSC_{vivo} ya corrige la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección por la interferencia de color, es necesario realizar un tercer control de color inespecífico con tejidos muertos (NSC_{muerto}). En este testigo adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto, que se someten a todo el procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo testigo de NSC_{muerto} es suficiente por producto problema cualquiera que sea el número de ensayos o tandas independientes realizados, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el % NSMTT menos el % NSC_{vivo} más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculado en relación con el testigo negativo que se lleva a cabo en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{muerto}).
32. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar las lecturas del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, cada laboratorio debe determinar el intervalo de linealidad de su espectrofotómetro con formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7) procedente de una fuente comercial antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos. La medición normal de la absorbancia (DO) mediante el uso de un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los productos problema que son reductores directos del MTT y los que interfieren con el color, cuando las DO de los extractos tisulares obtenidas con el producto problema sin ninguna corrección por la reducción directa del MTT o la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo

lineal del espectrofotómetro o cuando la viabilidad porcentual sin corregir obtenida con el producto problema ya es $\leq 50\%$. No obstante, los resultados correspondientes a productos problema que muestran un % NSMTT o un % NSC_{vivo} $\geq 50\%$ del testigo negativo deben tomarse con precaución, ya que este es el umbral utilizado para distinguir los productos clasificados de los no clasificados (véase el punto 36).

33. En el caso de los productos problema coloreados que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia (DO) debido a una interferencia demasiado fuerte con el ensayo del MTT, puede emplearse el procedimiento alternativo de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véase el punto 34) (36). El sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (36). Por esta razón, los controles NSC_{vivo} o NSC_{muerto} no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse los controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT o tiene un color que obstaculiza la evaluación de la capacidad de reducir directamente MTT (tal como se describe en el punto 29). Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de los productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de la viabilidad tisular obtenida con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el porcentaje de NSMTT. Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse los reductores directos de MTT que también pueden interferir con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (con medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (con espectrofotometría UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.
34. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse también para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (36). Debido a la diversidad de sistemas de espectrofotometría con HPLC/UPLC, antes de utilizar un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (36) (37). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 4. Una vez se hayan cumplido los

criterios de aceptación definidos en el apéndice 4, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

Criterios de aceptabilidad

35. En cada método de ensayo en que se utilicen lotes válidos de modelos de EHR (véase el punto 23), los tejidos tratados con el TN deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo. Los valores de DO del testigo no deben ser inferiores a los límites históricamente establecidos. Análogamente, los tejidos tratados con el TP, es decir solución acuosa de DSS al 5 %, deben reflejar su capacidad de responder a un producto irritante en las condiciones del método de ensayo [véase el apéndice 3 y, para más información, los procedimientos normalizados de trabajo de los cuatro modelos de ensayo incluidos en las presentes directrices de ensayo (32) (33) (34) (35)]. Las mediciones asociadas y adecuadas de la variabilidad entre las réplicas tisulares, es decir las desviaciones típicas (DT), deben estar dentro de los límites de aceptación establecidos para el modelo de ensayo utilizado (véase el apéndice 3).

Interpretación de los resultados y modelo de asignación

36. Los valores de DO obtenidos con cada producto problema pueden utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad normalizada respecto al TN, que se fija en el 100 %. Si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. Es necesario definir claramente y documentar, así como demostrar que son adecuados, el valor umbral del porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir los productos problema irritantes de los no clasificados, y el procedimiento o procedimientos estadísticos utilizados para evaluar los resultados e identificar los productos irritantes (véase más información en los procedimientos normalizados de trabajo). A continuación se indican los valores umbral para la asignación del efecto irritante:
- Se considera que el producto problema requiere clasificación y etiquetado con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP (categoría 2 o categoría 1) si el porcentaje medio de viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es inferior o igual ($\leq$) al 50 %. Dado que los modelos de ensayo con EHR incluidos en este método de ensayo no pueden distinguir entre las categorías 1 y 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, se exigirá más información sobre la corrosión cutánea para decidir sobre su clasificación final [véase también el documento de orientación de la OCDE sobre los IATA (3)]. Si se considera que el producto problema no es corrosivo (por ejemplo, sobre la base de los métodos de ensayo B.40, B.40 *bis* o B.65), y muestra una viabilidad tisular

después de la exposición y la incubación tras el tratamiento inferior o igual ($\leq$) al 50 %, se considera que el producto problema es irritante para la piel de acuerdo con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

- En función del marco normativo de los países miembros, el producto problema puede considerarse no irritante para la piel sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP si la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es superior ($>$) al 50 %.

DATOS E INFORME

Datos

37. Respecto a cada tanda, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas de tejido (p. ej., los valores de DO y los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada producto problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben indicarse las medias $\pm$ desviación típica de cada tanda. Con respecto a cada producto estudiado, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT y los productos problema coloreados.

Informe del ensayo

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

Productos problema y testigo:

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;
- Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- Origen; número de lote, si está disponible;
- Tratamiento del producto problema / productos testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;
- Condiciones de conservación.

Modelo de EHR y protocolo utilizados (y justificación de la elección, si procede).

Condiciones de ensayo:

- Modelo de EHR utilizado (incluido el número de lote);
- Información sobre la calibración del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro), la longitud de onda y el paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición;
- Descripción del método utilizado para cuantificar el MTT de formazano;
- Descripción de la aptitud del sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede;
- Información justificativa completa sobre el modelo de EHR concreto utilizado, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:
 - i) la viabilidad;
 - ii) la función de barrera;
 - iii) la morfología;
 - iv) la reproducibilidad y la capacidad de asignación;
 - v) los controles de calidad (CC) del modelo;
- Referencia a datos históricos del modelo. Esto debe incluir, entre otras cosas, la aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a los datos históricos del lote.
- Demostración de la competencia para la realización del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

Procedimiento de ensayo:

- Detalles del procedimiento de ensayo utilizado (incluidos los procedimientos de lavado utilizados tras el período de exposición);
- Dosis del producto problema y de los productos testigo utilizados;
- Duración y temperatura de la exposición y período de incubación tras la exposición;
- Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;
- Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (TP, testigo negativo, y NSMTT, NSC_{vivo} y NSC_{muerto}, en su caso);
- Descripción de los criterios de decisión / modelo de asignación aplicados sobre la base del modelo de EHR utilizado;
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo (incluidos los procedimientos de lavado).

Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo:

- Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

Resultados:

- Cuadros de datos de las mediciones con cada producto problema, cada tanda y cada réplica, incluidas la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular y la desviación típica;
- En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o colorantes, incluida la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % NSC_{vivo}, el % NSC_{muerto}, las desviaciones típicas y el porcentaje final correcto de viabilidad tisular;
- Resultados obtenidos con el producto o productos problema y testigos en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;
- Descripción de otros efectos observados;
- Clasificación derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html
- (2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Disponible en: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (4) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.
- (5) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Resistencia eléctrica transcutánea (RET):
- (6) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida (EHR).
- (7) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.
- (8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A

Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- (17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of

Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Nota: Se trata de las normas de comportamiento originales utilizadas para la validación de dos métodos de ensayo. Estas normas de comportamiento no deben seguir utilizándose, dado que ahora se dispone de una versión actualizada (8).*
- (22) EURL ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf
- (23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- (25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
- (26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- (30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403).
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mayo de 2001. Available at: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Nota: Esta es la versión actual de las normas de comportamiento del ECVAM, actualizadas en 2009 con vistas a la aplicación del SGA de las Naciones Unidas. Estas normas de comportamiento no deben seguir utilizándose, dado que ahora se dispone de una versión actualizada (8) en relación con las presentes directrices de ensayo.*
- (40) EURL ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) CE (2001). Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico 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 (Diario Oficial de la Unión Europea L 225 de 21.8.2001, p. 1).

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (9).

Viabilidad celular: Parámetro que mide la actividad total de una población celular como, por ejemplo, la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo], que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células vivas.

Producto: Sustancia o mezcla.

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento de los modelos de ensayo que dan un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “exactitud” se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (9).

TE₅₀: Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración del producto de referencia a una concentración fija determinada; véase también CI₅₀.

SGA [(Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (ONU))] Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IATA: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

CI₅₀: Puede estimarse determinando la concentración a la que un producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI₅₀) tras un tiempo fijo de exposición; véase también TE₅₀.

Dosis excesiva: Cantidad de producto problema aplicada a la epidermis que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie de la epidermis.

Mezcla: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

NSC_{muerto}: Color inespecífico en tejidos muertos.

NSC_{vivo}: Color inespecífico en tejidos vivos.

NSMTT: Reducción inespecífica del MTT.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (9).

TP: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (9).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (9).

Ensayo de sustitución: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación de peligros o la evaluación de riesgos, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todos los productos posibles (9).

Tanda: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un TP.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos problema activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Irritación cutánea *in vivo*: Formación de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de un producto durante hasta 4 horas. La irritación cutánea es una reacción que se produce localmente en el tejido cutáneo afectado y aparece poco después de la estimulación (38). Está causada por una reacción inflamatoria local que implica al sistema inmunitario innato (inespecífico) del tejido cutáneo. Su característica principal es consistir en un proceso reversible con presencia de reacciones inflamatorias y la mayoría de los signos clínicos característicos de la irritación (eritema, edema, prurito y dolor) relacionados con un proceso inflamatorio.

Especificidad: Proporción de todos los productos negativos o inactivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UPLC: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

Apéndice 2

MODELOS DE ENSAYO INCLUIDOS EN ESTE MÉTODO DE ENSAYO

N.º	Nombre del modelo de ensayo	Tipo de estudio de validación	Referencias
1	EpiSkin™	Estudio de validación prospectivo completo (2003-2007). Los componentes de este modelo se utilizaron para definir los componentes esenciales del método de ensayo de las normas de comportamiento del ECVAM originales y actualizadas (39) (40) (21)*. Además, los datos del método relativos a la identificación de las sustancias no clasificadas frente a las sustancias clasificadas constituyeron la base principal para definir los valores de especificidad y sensibilidad de las normas de comportamiento originales*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (original): Inicialmente, el modelo de ensayo fue objeto de una validación prospectiva completa junto con el n.º 1 desde 2003-2007. Los componentes de este modelo se utilizaron para definir los componentes esenciales de los métodos de ensayo de las normas de comportamiento del ECVAM originales y actualizadas (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): Se validó una modificación del EpiDerm™ original utilizando las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) en 2008*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Estudio de validación basado en las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) en 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Estudio de validación (2011-2012) basado en las normas de comportamiento de las directrices de ensayo de la OCDE TG 439 (8), basadas en las normas de comportamiento del ECVAM actualizadas* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) y normas de comportamiento de estas directrices de ensayo (8)*

*) Las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) se desarrollaron en 2007 tras la conclusión del estudio de validación prospectivo (16) que había evaluado el comportamiento de los modelos de ensayo n.ºs 1 y 2 en relación con el sistema de clasificación descrito en la 28ª modificación de la Directiva sobre sustancias peligrosas de la UE (41). En 2008, se introdujeron el SGA de las Naciones Unidas (1) y el CLP de la UE, desplazando efectivamente el valor umbral para distinguir las sustancias no clasificadas de las clasificadas a partir de una puntuación *in vivo* de 2,0 a 2,3. Para adaptarse a este requisito normativo modificado, se actualizaron en 2009 los valores de la exactitud y la lista de productos de referencia del ECVAM (2) (39) (40). Como las normas de comportamiento originales, también las actualizadas se basaban en gran medida en los datos de los modelos n.ºs 1 y 2 (16), pero usaban adicionalmente datos sobre los productos de referencia del modelo n.º 3. En 2010, las normas de comportamiento del ECVAM actualizadas se utilizaron para establecer las normas de comportamiento relacionadas con estas directrices de ensayo (8). A efectos del presente método de

ensayo, se considera que EpiSkin™ es el MRV, debido a que se utilizó para elaborar todos los criterios de las normas de comportamiento. En el documento explicativo del ECVAM/BfR sobre las correspondientes directrices de ensayo TG 439 de la OCDE (23) puede encontrarse información detallada sobre los estudios de validación, una compilación de los datos generados y los antecedentes de las adaptaciones necesarias de las normas de comportamiento como consecuencia de la aplicación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

SIT: Ensayo de irritación cutánea.

RHE: Epidermis humana reconstruida.

Apéndice 3

PARÁMETROS DEL PROTOCOLO ESPECÍFICOS DE CADA UNO DE LOS MODELOS DE ENSAYO INCLUIDOS EN ESTE MÉTODO DE ENSAYO

Los modelos de EHR muestran protocolos muy similares y, en particular, todos aplican un período de posincubación de 42 horas (32) (33) (34) (35). Las variaciones se refieren principalmente a tres parámetros relativos a las distintas funciones de barrera de los modelos de ensayo y que figuran en la lista siguiente: A) Tiempo y volumen de preincubación, B) Aplicación de los productos problema y C) Volumen posincubación.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preincubación				
Tiempo de incubación	18-24 horas	18-24 horas	< 2 horas	15-30 horas
Volumen de medio	2 ml	0,9 ml	0,3 o 1 ml	0,5 ml
B) Aplicación de los productos problema				
En caso de líquidos	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
En caso de sólidos	10 mg (26 mg/cm²) + AD (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + AD (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + AD (25 µl)
Utilización de malla de nailon	No se utiliza	Si es necesaria	Se aplica	No se utiliza
Tiempo total de aplicación	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos
Temperatura de aplicación	TA	a) TA durante 25 minutos b) 37 °C durante 35 minutos	TA	TA
C) Volumen de posincubación				
Volumen de medio	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilidad máxima aceptable				
Desviación típica entre réplicas tisulares	DT ≤ 18	DT ≤ 18	DT ≤ 18	DT ≤ 18

TA: Temperatura ambiente

AD: Agua destilada

DPBS: Solución salina amortiguadora con fosfato de Dulbecco

Apéndice 4

PARÁMETROS CLAVE Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CONSIDERAR APTO UN SISTEMA DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON HPLC/UPLC PARA LA MEDICIÓN DEL FORMAZANO DE MTT EXTRAÍDO DE TEJIDOS DE EHR

Parámetro	Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (36) (37)	Criterios de aceptación
Selectividad	Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de tejidos vivos de EHR sin tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de tejidos muertos de EHR sin tratamiento)	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}^1$
Precisión	Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Exactitud	Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Efecto de matriz	Controles de calidad con blanco vivo (n = 5)	$85 \% \leq \text{efecto de matriz} \leq 115 \%$
Efecto residual	Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC ²	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}$
Reproducibilidad (intradía)	Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml); Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	Curvas de calibración: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$ Controles de calidad: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ y } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducibilidad (interdiario)	Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)	
Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$
Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR, en caso necesario	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a la temperatura especificada (p.ej., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$

¹ LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.

² LOQ: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos, es decir, 200 µg/ml.».

8) En la parte B se añaden los capítulos siguientes:

«B.63. ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 421 de la OCDE (2016). Las directrices de la OCDE sobre los ensayos de productos se revisan periódicamente a la luz del progreso científico,. Las directrices de ensayo de cribado TG 421 originales se adoptaron en 1995 sobre la base de un protocolo de un «ensayo de cribado preliminar de toxicidad para la reproducción», debatido en dos reuniones de expertos, celebradas en Londres en 1990 (1) y en Tokio en 1992 (2).
2. Este método de ensayo se ha actualizado con parámetros pertinentes de alteración endocrina, como continuación de la actividad prioritaria iniciada en 1998 en la OCDE para revisar las directrices de ensayo vigentes y elaborar nuevas directrices de ensayo para el cribado y el ensayo de los alteradores endocrinos potenciales (3). Por ejemplo, las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE [Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores, capítulo B.7 del presente anexo] se reforzaron en 2008 con parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de los productos problema. El objetivo de la actualización de las directrices de ensayo TG 421 era incluir algunos parámetros relevantes de alteración endocrina en las directrices de ensayo de cribado, en las que los períodos de exposición cubren algunos de los períodos sensibles durante el desarrollo (periodos prenatal y posnatal inicial).
3. En las directrices de ensayo TG 421 se incluyeron los parámetros adicionales pertinentes de alteración endocrina seleccionados, que también forman parte de las directrices TG 443 (Estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación, capítulo B.56 del presente anexo), sobre la base de un estudio de viabilidad sobre cuestiones científicas y técnicas relacionadas con su inclusión, así como las posibles adaptaciones del diseño del ensayo necesarias para su inclusión (4).
4. El presente método de ensayo está diseñado para generar información limitada sobre los efectos de un producto problema en el comportamiento reproductor de los machos y de las hembras, tales como la actividad gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto. No es una alternativa ni sustituye a los métodos de ensayo existentes B.31, B.34, B.35 o B.56.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. Este método de ensayo de cribado puede utilizarse para proporcionar información inicial en cuanto a los posibles efectos sobre la reproducción o el desarrollo, en una fase temprana de la evaluación de las propiedades toxicológicas de los productos, o en cuanto a productos preocupantes. También puede utilizarse como parte de una serie de ensayos iniciales de cribado con sustancias existentes sobre las que se dispone de escasa o nula información toxicológica, como estudio de determinación del intervalo de dosis para estudios más amplios sobre la reproducción o el desarrollo, o en cualquier otro caso que se considere pertinente. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación de la OCDE n.º 19 sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (5).
6. El presente método de ensayo no proporciona información completa sobre todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo. En particular, solo ofrece medios limitados para detectar las manifestaciones postnatales de una exposición prenatal, o los efectos que puedan inducirse durante la exposición posnatal. Debido (entre otras razones) al número relativamente reducido de animales en los grupos tratados, la selectividad de los criterios de valoración y la corta duración del estudio, este método no aporta pruebas para hacer alegaciones definitivas de efectos nulos. Por otra parte, a falta de datos de otros ensayos de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales.
7. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos deben contemplarse en el contexto del "Marco conceptual para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos" (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (6). En este Marco conceptual, las directrices TG 421 mejoradas de la OCDE figuran en el nivel 4 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre los efectos adversos relativos a los parámetros endocrinos pertinentes. Sin embargo, una señal endocrina podría no considerarse prueba suficiente por sí misma de que el producto problema es un alterador endocrino.
8. En este método de ensayo se parte de la administración oral del producto problema. Es posible que se requieran modificaciones si se utilizan otras vías de exposición.
9. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.
10. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. Se administra el producto problema en dosis escalonadas a varios grupos de machos y hembras. Los machos deben recibir el producto durante un mínimo de cuatro semanas y hasta el día anterior al sacrificio programado (incluido dicho día) (lo que comprende un mínimo de dos semanas antes del apareamiento, el período de apareamiento y, aproximadamente, dos semanas después del apareamiento). Teniendo en cuenta lo limitado del período de administración a los machos antes del apareamiento, la fertilidad puede no ser un indicador específico sensible de la toxicidad testicular. Por lo tanto, es esencial un examen histológico detallado de los testículos. Para permitir la detección de la mayor parte de los efectos sobre la fertilidad masculina y la espermatogénesis, se considera suficiente la combinación de un período de administración antes del apareamiento de dos semanas y, posteriormente, observaciones sobre el apareamiento y la fertilidad, con un período de administración total de al menos cuatro semanas, seguido de un examen histopatológico detallado de las gónadas masculinas.
12. Las hembras deben recibir el producto problema a lo largo de todo el estudio. Se incluyen aquí dos semanas antes del apareamiento (con el objetivo de abarcar por lo menos dos ciclos estrales completos), el período de tiempo variable hasta la concepción, la duración de la gestación y al menos trece días después del parto, hasta el día anterior al sacrificio programado, inclusive.
13. La duración del estudio, tras la aclimatación y la evaluación del ciclo estral antes de la administración del producto problema, depende del comportamiento de las hembras y es de aproximadamente 63 días, [14 días como mínimo antes del apareamiento, (hasta) 14 días de apareamiento, 22 días de gestación y 13 días de lactancia].
14. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el período del ensayo, y al final del mismo se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

15. Este método de ensayo está diseñado para su uso con la rata. Si los parámetros especificados en el presente método de ensayo se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos en las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE (correspondientes al capítulo B.7 del presente anexo), la única especie utilizada fue la rata. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Han de utilizarse animales

vírgenes sanos, no sometidos a experimentación previa. Deben especificarse la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales utilizados en el ensayo. Al empezar el estudio, la variación del peso de los animales utilizados ha de ser mínima y no exceder del $\pm 20 \%$ del peso medio de cada sexo. Cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio a largo plazo o de una generación completa, es preferible que en ambos estudios se utilicen animales de la misma cepa y de la misma fuente.

Alojamiento y alimentación de los animales

16. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales de cuidado de los animales de laboratorio. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Aunque la humedad relativa debe ser del 30% como mínimo y preferiblemente no superar el 70% , excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el $50\text{-}60 \%$. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método.
17. Los animales deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo; pueden alojarse de forma individual si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de cinco animales en cada jaula. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Las hembras gestantes deben enjaularse de forma individual y disponer de materiales de nidificación. Las hembras en período de lactancia deben enjaularse de forma individual con sus crías.
18. Se debe analizar regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

Preparación de los animales

19. Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los grupos tratados y los grupos testigo. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

Preparación de las dosis

20. Se recomienda administrar el producto problema oralmente, a menos que se consideren más adecuadas otras vías de administración. Cuando se selecciona la vía oral, el producto problema suele administrarse por sonda; sin embargo, los productos problema pueden administrarse alternativamente con el alimento o el agua de bebida.

21. En caso necesario, el producto problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad y homogeneidad del producto problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

22. Se recomienda que cada grupo comience con un mínimo de 10 machos y entre 12 y 13 hembras. Las hembras se evaluarán antes de la exposición en relación con el ciclo estral y no se incluirán en el estudio los animales que no presenten ciclos típicos de 4 a 5 días; por lo tanto, se recomienda añadir más hembras para conseguir 10 hembras por grupo. Excepto en el caso de efectos tóxicos marcados, se espera que de esta forma se consigan al menos 8 hembras gestantes por grupo, que normalmente es el número mínimo aceptable de hembras gestantes por grupo. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones y descendientes para garantizar una evaluación significativa del potencial del producto problema para afectar a la fertilidad, gestación, comportamiento materno y lactante, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes F_1 , desde la concepción hasta 13 días después del parto.

Posología

23. Deben utilizarse generalmente como mínimo tres grupos de ensayo y un grupo testigo. Las dosis pueden basarse en la información procedente de ensayos de toxicidad aguda o en los resultados de estudios de administración continuada. A excepción de la administración del producto problema, los animales del grupo testigo deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para administrar el producto problema, el grupo testigo debe recibir el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.
24. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad y (toxico)cinética disponibles. También debe tenerse en cuenta que puede haber diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados (NOAEL) con la dosis inferior. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.

25. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre los parámetros sensibles endocrinos.

Ensayo límite

26. Si en un estudio oral en el que se administra una sola dosis de al menos 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración en la comida o en el agua de bebida, en el que se utiliza un porcentaje equivalente en los alimentos o el agua de bebida, siguiendo los procedimientos descritos en este estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis diferentes. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis oral superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas del producto problema las que determinan la concentración máxima que puede alcanzarse.

Administración del producto problema

27. El producto problema se administra diariamente a los animales durante 7 días a la semana. Si el producto problema se administra por sonda, debe hacerse en una dosis única y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo con las diferentes dosis.
28. En el caso de productos problema administrados con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades administradas de producto problema no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando el producto problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe indicarse qué alternativa se ha seguido. Si el producto problema se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal.

Calendario del experimento

29. La administración del producto a ambos sexos debe comenzar al menos dos semanas antes del apareamiento, una vez que se han aclimatado durante al menos cinco días y las hembras han sido sometidas a cribado para confirmar que sus ciclos estrales son normales (en un período de dos semanas antes del tratamiento). El estudio debe programarse de tal manera que la evaluación del ciclo estral comience pronto después de que los animales hayan alcanzado la madurez sexual completa. Esto puede variar ligeramente según las diferentes cepas de ratas en distintos laboratorios; por ejemplo, en las ratas Sprague Dawley corresponde a 10 semanas de edad y en las ratas Wistar a unas 12 semanas de edad. Las madres con descendencia deben sacrificarse el día 13 después del parto, o poco después. El día del nacimiento (es decir, cuando se completa el parto) se define como el día 0 después del parto. Las hembras que no presentan signos de apareamiento se sacrifican entre 24 y 26 días después del último día del período de apareamiento. Se continúa la administración del producto problema a los dos sexos durante el período de apareamiento. Los machos deben seguir recibiendo el producto problema después del período de apareamiento, al menos hasta que se haya completado el período mínimo total de tratamiento de 28 días. A continuación se les da muerte o, alternativamente, se conservan y se les sigue administrando el producto para la posible realización de un segundo apareamiento si se considera adecuado.
30. La administración diaria del producto problema a las hembras parentales debe mantenerse a lo largo de toda la gestación y, como mínimo, hasta el día 13 después del parto o el día anterior al sacrificio, inclusive. En los estudios en que el producto problema se administre por inhalación o por vía cutánea, esta administración debe continuar como mínimo hasta el día 19 de la gestación, inclusive, y debe volver a iniciarse lo antes posible y, a más tardar, el día posnatal (DPN) 4.
31. En el apéndice 2 figura un diagrama del programa experimental.

Procedimiento del apareamiento

32. Normalmente, en este estudio deben utilizarse apareamientos 1 : 1 (un macho con una hembra). Pueden darse excepciones en caso de muertes ocasionales de machos. Se recomienda colocar a la hembra con el mismo macho hasta que se observen signos de apareamiento o hayan transcurrido dos semanas. Las hembras deben examinarse cada mañana para determinar la presencia de esperma o de tapón vaginal. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Si no tiene éxito el apareamiento, puede plantearse otro intento de aparear hembras con machos de comprobada capacidad reproductora del mismo grupo.

Tamaño de la camada

33. El día 4 después del nacimiento, podrá ajustarse el tamaño de cada camada eliminando las crías excedentarias mediante selección aleatoria con el fin de obtener, en la medida de lo posible, cuatro o cinco crías por sexo y por camada en función del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada. Se deben tomar muestras de sangre de dos de las crías excedentarias; tales muestras se mezclan y se utilizan para determinar los niveles de T4 en el suero. No es adecuado eliminar crías de forma selectiva, por ejemplo sobre la base del peso corporal o la distancia anogenital (DAG). Cuando el número de crías machos o hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro o cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras). No se eliminará ninguna cría cuando el tamaño de la camada descienda por debajo del objetivo de la eliminación (8 o 10 crías/camada). Si solo se dispone de una única cría por encima del objetivo de la eliminación, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.
34. Si no se ajusta el tamaño de la camada, se sacrifican dos crías por camada el día 4 después del nacimiento y se toman muestras de sangre para medir las concentraciones de la hormona tiroidea en el suero. Si es posible, las dos crías por camada deben ser hembras, a fin de reservar las crías macho para las evaluaciones del mantenimiento de pezones, salvo en caso de que la eliminación de estas crías no deje hembras suficientes para la evaluación en el momento del sacrificio. No se eliminarán las crías cuando el tamaño de la camada descienda por debajo de 8 o 10 crías/camada (dependiendo del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada). Si solo se dispone de una única cría por encima del tamaño normal de la camada, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

OBSERVACIONES EN VIVO

Observaciones clínicas

35. Durante todo el ensayo, deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con mayor frecuencia cuando se observen signos de toxicidad. Deben hacerse preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se deben registrar los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. Estos registros deben incluir el momento de aparición, el grado y la duración de los signos de toxicidad.

Peso corporal y consumo de alimento y agua

36. Los machos y las hembras deben pesarse el primer día de la administración del producto problema, después al menos una vez por semana, y en el momento del sacrificio. Durante la gestación, las hembras deben pesarse en los días 0, 7, 14 y 20 y dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Estas observaciones se registran respecto a cada animal adulto por separado.

37. Durante el período previo al apareamiento, la gestación y la lactancia, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. La medición del consumo de alimentos durante el apareamiento es opcional. El consumo de agua durante estos períodos también debe medirse si el producto problema se administra a través del agua de bebida.

Ciclos estrales

38. Deben supervisarse los ciclos estrales antes de que se inicie el tratamiento, a fin de seleccionar para el estudio las hembras con ciclos regulares (véase el punto 22). También hay que efectuar un seguimiento diario de los frotis vaginales desde el principio del período de tratamiento hasta que se observen signos de apareamiento. Si hay preocupación por que los efectos del estrés agudo puedan modificar los ciclos estrales con el inicio de la administración del producto, los laboratorios pueden exponer a los animales de ensayo durante 2 semanas, hacer a continuación frotis vaginales diarios para supervisar el ciclo estral durante un mínimo de dos semanas durante el período previo al apareamiento, y continuar la supervisión en el período de apareamiento hasta que haya signos de apareamiento. En el momento de la obtención de las células de la vagina o del cuello del útero, hay que tener cuidado para evitar la alteración de la mucosa, que podría provocar una pseudogestación (7) (8).

Parámetros de los descendientes

39. Debe registrarse la duración de la gestación y calcularse a partir del día 0 de la gestación. Cada camada debe examinarse lo antes posible después del parto para determinar el número y sexo de las crías, los mortinatos, los nacidos vivos y los nacidos con retraso evidente (crías que sean significativamente menores que las crías testigo correspondientes) y la presencia de anomalías macroscópicas.
40. Las crías vivas deben contarse y clasificarse por sexo, y las camadas pesarse dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Además de las observaciones descritas en el punto 35, debe registrarse cualquier eventual comportamiento anómalo de la descendencia.
41. La distancia anogenital (DAG) de cada cría debe medirse el mismo día postnatal, entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe tomarse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (9). El número de pezones/areolas en las crías macho debe contarse el DPN 12 o 13, según lo recomendado en el documento de orientaciones GD 151 de la OCDE (10).

Bioquímica clínica

42. Se toman muestras de sangre de un lugar definido sobre la base del siguiente calendario:

- de al menos dos crías por camada el día 4 después del parto, si el número de crías lo permite (véanse los puntos 33-34),
- de todas las madres y al menos dos crías por camada, en el momento del sacrificio el día 13, y
- de todos los machos adultos, en el momento del sacrificio.

Todas las muestras de sangre se conservan en condiciones adecuadas. Las muestras de sangre de las crías del día 13 y las de los machos adultos se evalúan en cuanto a los niveles de hormonas tiroideas en suero (T4). Si procede, se lleva a cabo una evaluación adicional de la T4 en las muestras de sangre de las madres y de las crías del día 4. Como opción pueden medirse otras hormonas si son pertinentes. La sangre de las crías puede ponerse en común por camadas para efectuar los análisis de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas (T4 y TSH) deben medirse preferentemente como «total».

43. Los siguientes factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:

- el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,
- el método de sacrificio, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,
- los equipos de ensayo para la determinación de las hormonas, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

44. Las muestras de plasma destinadas específicamente a la determinación de las hormonas deben obtenerse a una hora comparable del día. Las cifras obtenidas al analizar las concentraciones de hormonas varían con los equipos comerciales de ensayo que se usan para el análisis.

Anatomía patológica

Autopsia macroscópica

45. En el momento del sacrificio o de la muerte en el transcurso del estudio, los animales adultos deben someterse a un examen macroscópico para detectar los eventuales cambios patológicos o anomalías. Se debe prestar especial atención a los órganos sexuales. Debe registrarse el número de puntos de implantación. Deben examinarse frotis vaginales en la mañana del día de la autopsia para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con el examen histopatológico de los ovarios.

46. Los testículos y epidídimos, así como la próstata y las vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, de todos los machos adultos deben limpiarse de los tejidos adherentes, según proceda, y su peso húmedo debe tomarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Además, el peso de órganos opcionales podría incluir el complejo del músculo elevador del ano y el músculo bulbocavernoso, las glándulas de

Cowper y el glándula del pene en los machos y los ovarios emparejados (peso húmedo) y el útero (incluido el cuello) en las hembras; si se incluyen, estos pesos deben tomarse lo antes posible tras la disección.

47. Las crías muertas y las crías sacrificadas el día 13 después del parto, o poco después, deben, al menos, ser examinadas externamente de forma detenida para detectar la eventual presencia de anomalías macroscópicas. Debe prestarse especial atención a los órganos genitales externos, en los que debe estudiarse la eventual presencia de signos de alteración en el desarrollo. El día 13 debe tomarse y conservarse la glándula tiroidea de 1 cría macho y 1 cría hembra por camada.
48. Se deben conservar los ovarios, testículos, órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimos, próstata, vesículas seminales más glándulas coagulantes), glándula tiroidea y todos los órganos que muestren lesiones macroscópicas de todos los animales adultos. No se recomienda la fijación con formol para el examen sistemático de testículos y epidídimos. Un método aceptable es el uso del fijador de Bouin o el de Davidson modificado para estos tejidos (11). Con una aguja se puede puncionar suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador.

Examen histopatológico

49. Se debe realizar un examen histológico detallado de los ovarios, testículos y epidídimos (con especial énfasis en las fases de espermatogénesis e histopatología de la estructura celular testicular intersticial) de los animales del grupo de dosis más elevada y del grupo testigo. En caso necesario, podrán examinarse los demás órganos conservados, incluida la glándula tiroidea de las crías y de los animales adultos. El peso de la glándula tiroidea puede determinarse después de su fijación. Su disección debe hacerse también de manera muy cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares, ya que estos podrían comprometer el examen histopatológico. El examen debe ampliarse a los animales de otros grupos de tratamiento si se observan cambios en el grupo que ha recibido la dosis mayor. El documento de orientación sobre histopatología (11) proporciona más información acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.

DATOS E INFORME

Datos

50. Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, todos los datos deben resumirse en forma de cuadro que recoja, respecto a cada grupo de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o del sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de animales que

presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada. En el apéndice 3 figura un modelo de informe resumido en forma de cuadro que ha demostrado ser muy útil para la evaluación del efecto sobre la reproducción y el desarrollo.

51. Debido a las dimensiones limitadas del estudio, los análisis estadísticos en forma de ensayos de “significación” tienen un valor limitado respecto a muchos parámetros, especialmente a los de la reproducción. Si se utilizan análisis estadísticos, entonces el método elegido debe ser apropiado para la distribución de la variable examinada, y ser seleccionado antes de que se inicie el estudio. El análisis estadístico de la DAG y del mantenimiento de pezones debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta los efectos de camada. Cuando proceda, la camada es la unidad de análisis. El análisis estadístico del peso corporal de las crías debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta el tamaño de la camada. Debido a lo reducido del tamaño del grupo, la utilización de datos históricos de control (por ejemplo, sobre el tamaño de la camada), en su caso, también puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio.

Evaluación de los resultados

52. Los resultados de este estudio de toxicidad deben evaluarse en términos de efectos observados, autopsia y resultados microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación entre la dosis de producto problema y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, esterilidad, anomalías clínicas, alteración del comportamiento reproductor y con la prole, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.
53. Debido al breve período de tratamiento de los machos, el examen histopatológico de los testículos y epidídimos debe tenerse en cuenta junto con los datos de fertilidad, al evaluar los efectos para la reproducción masculina. También puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio el uso de datos de controles históricos sobre reproducción o desarrollo (por ejemplo, en cuanto al tamaño de la camada, DAG, mantenimiento de pezones, niveles séricos de T4), cuando se disponga de ellos.
54. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar los datos de los controles históricos y calcular los coeficientes de variación de los datos numéricos, especialmente en cuanto a los parámetros relacionados con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

Informe del ensayo

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

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;
- estabilidad del producto problema, si se conoce.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales de ensayo:

- especie y cepa empleada;
- número, edad y sexo de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo;
- justificación de la especie si es distinta de la rata.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la selección de las dosis;
- datos sobre la formulación del producto problema o su preparación con los alimentos, concentraciones obtenidas, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- datos sobre la administración del producto problema;
- factor de conversión de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada del procedimiento de aleatorización de la selección de crías para el sacrificio, en su caso.

Resultados:

- peso corporal y variaciones del mismo;
- consumo de alimentos y de agua, si se ha medido;
- datos de la respuesta tóxica por sexo y dosis, incluida la fertilidad, la gestación y cualquier otro signo de toxicidad;
- duración de la gestación;
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la descendencia, el crecimiento postnatal, etc.;
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no);
- número de hembras adultas con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;
- número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias;
- datos sobre el peso corporal de las crías;
- DAG de todas las crías (y peso corporal el día de la medición de la DAG);
- mantenimiento de pezones en las crías macho;
- niveles de la hormona tiroidea, en machos adultos y crías el día 13 (y madres y crías el día 4 si se miden);
- número de crías con anomalías visibles macroscópicamente, evaluación macroscópica de los genitales externos, número de nacidos con retraso evidente;
- momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;
- número de implantes, tamaño de la camada y pesos de la camada en el momento del registro;
- peso corporal en el momento del sacrificio y peso de los órganos de los animales parentales;
- observaciones de la autopsia;
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos;
- datos relativos a la absorción (si procede);
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

Interpretación de los resultados

56. El estudio pretende evaluar la toxicidad para la reproducción o el desarrollo relacionada con la administración continuada de dosis (véanse los puntos 5 y 6). Podría dar una indicación de la necesidad de realizar nuevas investigaciones y proporciona orientaciones para el diseño de estudios posteriores. Debe consultarse el documento de orientación n.º 43 de la OCDE para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de toxicidad para la reproducción y el desarrollo (12). El documento de orientación n.º 106 de la OCDE sobre la evaluación histológica de los ensayos endocrinos y de reproducción en roedores (11) proporciona información sobre la preparación y evaluación de los órganos (endocrinos) y los frotis vaginales que puede ser útil para las presentes directrices de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.
- (6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, Nueva York.
- (9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.
- (10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

- (11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

Apéndice 1

DEFINICIONES [VÉASE TAMBIÉN EL DOCUMENTO DE ORIENTACIONES GD 150 DE LA OCDE (6)]

Androgenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17 β -estradiol) en el organismo de un mamífero.

Actividad antitiroidea: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Producto: Sustancia o mezcla.

Toxicidad para el desarrollo: Manifestación de la toxicidad para la reproducción que consiste en la presencia de trastornos pre-, peri- y posnatales, de tipo estructural o funcional, en la descendencia.

Posología: Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

Dosis: Cantidad de producto problema administrada. La dosis se expresa en peso del producto problema por unidad de peso corporal de animal de ensayo y día (p. ej., mg/kg peso corporal/día), o como concentración alimentaria constante.

Toxicidad evidente: Término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de un producto problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y tales que, ante un aumento de la dosis administrada, quepa esperar como resultado la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Disminución de la fertilidad: Trastornos en la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras o de los machos.

Toxicidad para la madre: Efectos adversos en las hembras gestantes, tanto si se producen de forma específica (efecto directo) como inespecífica (efecto indirecto).

NOAEL: Abreviatura en inglés de nivel sin efectos adversos observados (*no-observed-adverse effect level*). Se trata de la dosis más elevada a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

Estrogenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17 β -estradiol) en el organismo de un mamífero.

Toxicidad para la reproducción: Efectos nocivos para la descendencia y/o disminución de la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras y de los machos.

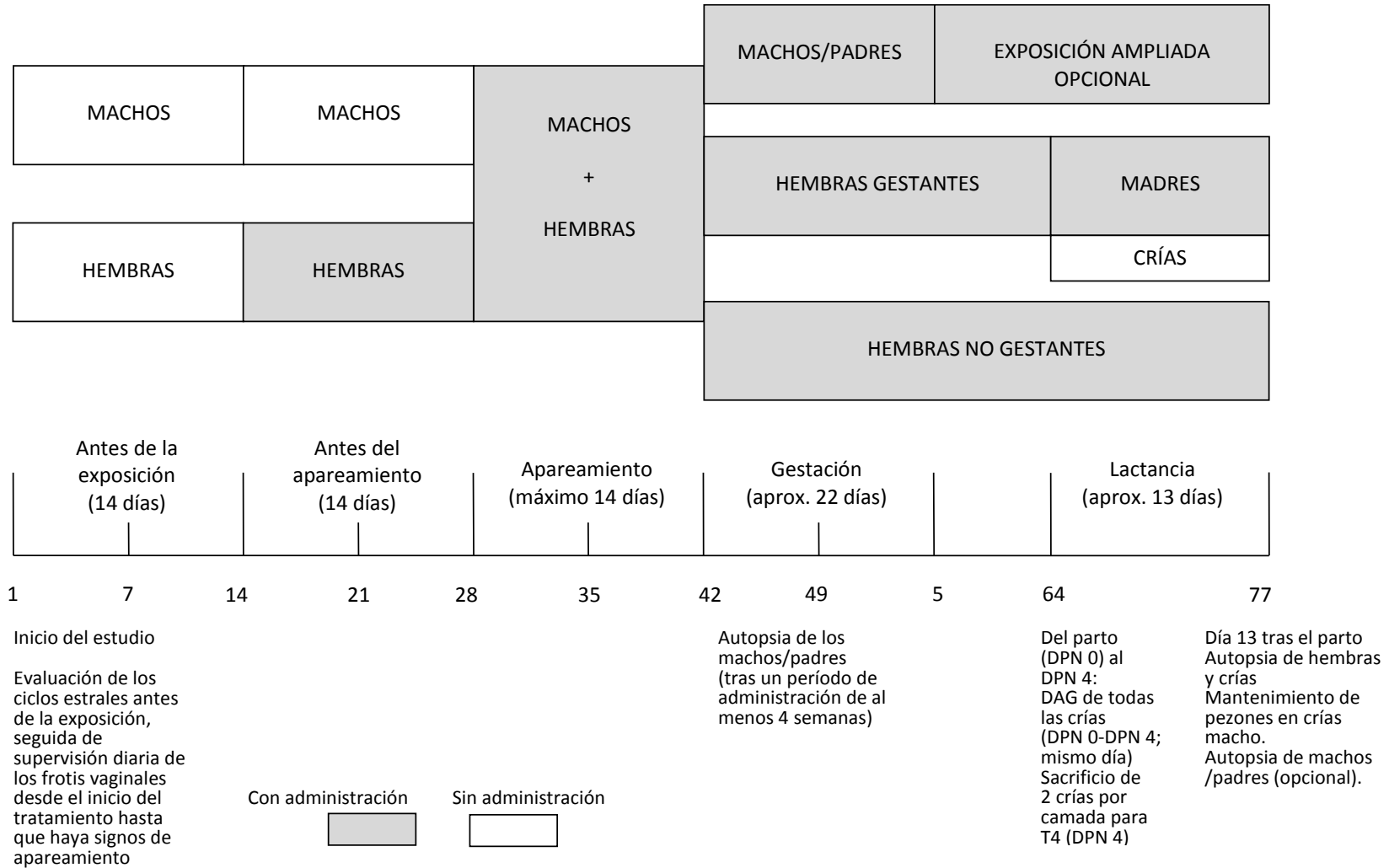
Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Actividad tiroidea: Capacidad de un producto para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Validación: Procedimiento científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

Apéndice 2

DIAGRAMA DEL PROGRAMA EXPERIMENTAL CON INDICACIÓN DE LA DURACIÓN MÁXIMA DEL ESTUDIO, SOBRE LA BASE DE UN PERÍODO DE APAREAMIENTO COMPLETO DE CATORCE DÍAS



Apéndice 3

INFORME RESUMIDO EN FORMA DE CUADRO SOBRE LOS EFECTOS PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

OBSERVACIONES	VALORES				
Dosis (unidades)	0 (testigo)	..	..	..	..
		.	.	.	.
Parejas al inicio (N)					
Ciclo estral (por lo menos, longitud media y frecuencia de ciclos irregulares)					
Hembras que presentan signos de cópula (N)					
Hembras que llegan a la gestación (N)					
Días de concepción 1-5 (N)					
Días de concepción 6-... ⁽¹⁾ (N)					
Gestación ≤ 21 días (N)					
Gestación = 22 días (N)					
Gestación ≥ 23 días (N)					
Madres con crías nacidas vivas (N)					
Madres con crías vivas el día 4 después del parto (N)					
Implantes/madre (media)					
Crías vivas/madre en el momento del nacimiento (media)					
Crías vivas/madre el día 4 (media)					
Proporción de sexos (m/f) en el momento del nacimiento (media)					
Proporción de sexos (m/f) el día 4 (media)					
Peso de la camada al nacer (media)					
Peso de la camada el día 4 (media)					

⁽¹⁾ Último día del período de apareamiento.

Peso de las crías al nacer (media)					
Peso de las crías en el momento de la medición de la DAG (media de los machos, media de las hembras)					
DAG de las crías en el mismo día posnatal, nacimiento – día 4 (media de los machos, media de las hembras, indíquese el DPN)					
Peso de las crías el día 4 (media)					
Mantenimiento de pezones en las crías macho al día 13 (media)					
Peso de las crías el día 13 (media)					
CRÍAS ANÓMALAS					
Madres con 0					
Madres con 1					
Madres con ≥ 2					
PÉRDIDA DE DESCENDENCIA					
Prenatal tras el implante (implantes menos nacimientos vivos)					
Hembras con 0					
Hembras con 1					
Hembras con 2					
Hembras con ≥ 3					
Posnatal (nacidos vivos menos vivos el día 13 posnatal)					
Hembras con 0					
Hembras con 1					
Hembras con 2					
Hembras con ≥ 3					

B.64. ESTUDIO DE TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA COMBINADO CON EL ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 422 de la OCDE (2016). Las directrices de la OCDE sobre los ensayos de productos se revisan periódicamente a la luz del progreso científico,. Las directrices de ensayo de cribado TG 422 originales se adoptaron en 1996 sobre la base de un protocolo de un “Estudio de toxicidad por administración continuada combinado con el ensayo de cribado de toxicidad para la reproducción o el desarrollo”, debatido en dos reuniones de expertos, celebradas en Londres en 1990 (1) y en Tokio en 1992 (2).
2. El presente método de ensayo combina una parte de cribado de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo que se basa en la experiencia adquirida en los Estados miembros a partir de la utilización del método original con productos existentes de alto volumen de producción y en ensayos exploratorios con sustancias testigo positivo (3) (4), así como una parte de toxicidad por administración continuada, en concordancia con las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE [estudio de toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores, correspondiente al capítulo B.7 del presente anexo].
3. Este método de ensayo se ha actualizado con parámetros pertinentes de alteración endocrina, como continuación de la actividad prioritaria iniciada en 1998 en la OCDE para revisar las directrices de ensayo vigentes y elaborar nuevas directrices de ensayo para el cribado y el ensayo de los alteradores endocrinos potenciales (5). En este contexto, las TG 407 (correspondiente al capítulo B.7 del presente anexo) se mejoraron en 2008 mediante parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de los productos problema. El objetivo de la actualización de las directrices de ensayo TG 422 era incluir algunos parámetros relevantes de alteración endocrina en las directrices de ensayo de cribado, en las que los períodos de exposición cubren algunos de los períodos sensibles durante el desarrollo (períodos prenatal y posnatal inicial).
4. En las directrices de ensayo TG 422 se incluyeron los parámetros adicionales pertinentes de alteración endocrina seleccionados, que también forman parte de las directrices TG 443 (Estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación, correspondiente al capítulo B.56 del presente anexo), sobre la base de un estudio de viabilidad sobre cuestiones científicas y técnicas relacionadas con su inclusión, así como las posibles adaptaciones del diseño del ensayo necesarias para su inclusión (6).

5. El presente método de ensayo está diseñado para generar información limitada sobre los efectos de un producto problema en el comportamiento reproductor de los machos y de las hembras, tales como la actividad gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto. No es una alternativa ni sustituye a los métodos de ensayo existentes B.31, B.34, B.35 o B.56.

CONSIDERACIONES INICIALES

6. Al determinar y evaluar las características tóxicas de un producto problema, el estudio de la toxicidad oral por administración continuada puede estar indicado cuando la información inicial relativa a la toxicidad se haya obtenido mediante ensayos de toxicidad aguda. Este estudio proporciona información sobre los posibles peligros para la salud que pueden derivarse de la exposición continuada durante un período de tiempo relativamente limitado. El método describe el estudio básico de toxicidad por administración continuada que puede aplicarse en el caso de productos para los que no está justificado un estudio de 90 días (por ejemplo, cuando el volumen de producción no supera ciertos límites), o bien como estudio preliminar de un estudio de toxicidad a largo plazo. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación n.º 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (7).
7. Además, incluye un ensayo de cribado de la toxicidad para la reproducción y el desarrollo y, por tanto, también puede utilizarse para proporcionar información inicial sobre los posibles efectos en el comportamiento reproductivo de los machos y las hembras, tales como la función gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto, sea en una fase temprana de la evaluación de las propiedades toxicológicas de los productos problema o sea con los productos problema preocupantes. El presente método de ensayo no proporciona información completa sobre todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo. En particular, solo ofrece medios limitados para detectar las manifestaciones postnatales de una exposición prenatal, o los efectos que puedan inducirse durante la exposición posnatal. Debido (entre otras razones) a la selectividad de los criterios de valoración y a la corta duración del estudio, este método no aporta pruebas para hacer alegaciones definitivas de efectos nulos sobre la reproducción o el desarrollo. Por otra parte, a falta de datos de otros ensayos de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales.
8. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos deben contemplarse en el contexto del "Marco conceptual para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos" (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting*

Chemicals) de la OCDE (8). En este Marco conceptual, las directrices TG 422 mejoradas de la OCDE figuran en el nivel 4 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre los efectos adversos relativos a los parámetros endocrinos pertinentes. Sin embargo, una señal endocrina podría no considerarse prueba suficiente por sí misma de que el producto problema es un alterador endocrino.

9. El método de ensayo insiste más en los efectos neurológicos como parámetro específico, y destaca la necesidad de hacer observaciones clínicas atentas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método debe detectar los productos con potencial neurotóxico, y respecto a los que pueda justificarse la realización de investigaciones más profundas de este aspecto. Además, el método puede dar también una indicación básica de los efectos inmunológicos.
10. A falta de datos de otros estudios de toxicidad sistémica, de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, de neurotoxicidad o de inmunotoxicidad, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales. El ensayo puede ser especialmente útil como parte de la serie de datos de información de examen (SIDS, *Screening Information Data Set*) de la OCDE para la evaluación de los productos existentes respecto a los que se dispone de escasa o nula información toxicológica y pueden servir como alternativa a la realización de dos ensayos aparte, uno de la toxicidad por administración continuada (TG 407 de la OCDE, correspondientes al capítulo B.7 del presente anexo) y otro de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo (TG 421 de la OCDE, correspondientes al capítulo B.63 del presente anexo). También puede utilizarse como estudio de determinación del intervalo de dosis para estudios más amplios sobre la reproducción o el desarrollo, o en cualquier otro caso que se considere pertinente.
11. En general, se supone que existen diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. Por consiguiente, puede ser más complicado determinar qué dosis son adecuadas para evaluar tanto la toxicidad general sistémica como la toxicidad específica para la reproducción o el desarrollo en esta combinación de ensayos que cuando se realizan por separado los distintos ensayos. Por otra parte, la interpretación de los resultados de los ensayos con respecto a la toxicidad sistémica general puede ser más difícil que cuando se realiza un estudio aparte de administración continuada, especialmente si los parámetros séricos y de histopatología no se evalúan al mismo tiempo en el estudio. Debido a estas complejidades técnicas, se requiere una considerable experiencia con los ensayos de toxicidad para la realización de este ensayo de cribado combinado. Por otra parte, aparte del menor número de animales implicados, el ensayo combinado puede ofrecer un medio mejor de discriminar los efectos directos sobre la reproducción o el desarrollo frente a los que son secundarios a otros efectos (sistémicos).

12. En este ensayo, el período de administración es más largo que en un estudio de administración continuada de 28 días. Sin embargo, utiliza menos animales de cada sexo por grupo en comparación con la situación en la que se lleva a cabo un estudio clásico de administración continuada de 28 días además de un ensayo de cribado de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo.
13. En este método de ensayo se parte de la administración oral del producto problema. Es posible que se requieran modificaciones si se utilizan otras vías de exposición.
14. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.
15. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

16. Se administra el producto problema en dosis escalonadas a varios grupos de machos y hembras. Los machos deben recibir el producto durante un mínimo de cuatro semanas, hasta el día anterior al sacrificio programado (incluido dicho día), lo que comprende un mínimo de dos semanas antes del apareamiento, el período de apareamiento y, aproximadamente, dos semanas después del apareamiento. Teniendo en cuenta lo limitado del período de administración a los machos antes del apareamiento, la fertilidad puede no ser un indicador particularmente sensible de la toxicidad testicular. Por lo tanto, es esencial un examen histológico detallado de los testículos. Para permitir la detección de la mayor parte de los efectos sobre la fertilidad masculina y la espermatogénesis, se considera suficiente la combinación de un período de administración antes del apareamiento de dos semanas y, posteriormente, observaciones sobre el apareamiento y la fertilidad, con un período de administración total de al menos cuatro semanas, seguido de un examen histopatológico detallado de las gónadas masculinas.
17. Las hembras deben recibir el producto problema a lo largo de todo el estudio. Se incluyen aquí dos semanas antes del apareamiento (con el objetivo de abarcar por lo menos dos ciclos estrales completos), el período de tiempo variable hasta la concepción, la duración de la gestación y al menos trece días después del parto, hasta el día anterior al sacrificio programado, inclusive.
18. La duración del estudio, tras la aclimatación y la evaluación del ciclo estral antes de la administración del producto problema, depende del comportamiento de las hembras y es de aproximadamente 63 días, [14 días como mínimo antes del apareamiento, (hasta) 14 días de apareamiento, 22 días de gestación y 13 días de lactancia].

19. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

20. Este método de ensayo está diseñado para su uso con la rata. Si los parámetros especificados en estas directrices de ensayo TG 422 se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos en relación con las directrices de ensayo TF 407, la única especie utilizada fue la rata. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Han de utilizarse animales vírgenes sanos, no sometidos a experimentación previa. Deben especificarse la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales utilizados en el ensayo. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales empleados ha de ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio a largo plazo o de una generación completa, es preferible que en ambos estudios se utilicen animales de la misma cepa y de la misma fuente.

Alojamiento y alimentación de los animales

21. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales del cuidado de los animales de laboratorio. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30% y preferentemente no superar el 70% , salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método.
22. Los animales deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo; pueden alojarse de forma individual si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de cinco animales en cada jaula. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Las hembras gestantes deben enjaularse de forma individual y disponer de materiales de nidificación. Las hembras en período de lactancia deben enjaularse de forma individual con sus crías.

23. Se debe analizar regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

Preparación de los animales

24. Se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos, y se asignan a las jaulas y grupos tratados. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

Preparación de las dosis

25. Se recomienda administrar el producto problema oralmente a menos que se consideren más adecuadas otras vías de administración. Cuando se selecciona la vía oral, el producto problema suele administrarse por sonda; sin embargo, los productos problema también pueden administrarse alternativamente con el alimento o el agua de bebida.
26. En caso necesario, el producto problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. En caso de vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad y homogeneidad del producto problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

27. Se recomienda que cada grupo comience con un mínimo de 10 machos y entre 12 y 13 hembras. Las hembras se evaluarán antes de la exposición en relación con el ciclo estral y no se incluirán en el estudio los animales que no presenten ciclos típicos de 4 a 5 días; por lo tanto, se recomienda añadir más hembras para conseguir 10 hembras por grupo. Excepto en el caso de efectos tóxicos marcados, se espera que de esta forma se consigan al menos 8 hembras gestantes por grupo, que normalmente es el número mínimo aceptable de hembras gestantes por grupo. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones y descendientes para garantizar una evaluación significativa del potencial del producto problema para afectar a la fertilidad, gestación, comportamiento materno y lactante, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes F₁, desde la concepción hasta 13 días después del parto. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. Debe estudiarse la conveniencia de utilizar un grupo satélite adicional de cinco animales por sexo en los grupos testigo y de dosis más elevada para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos sistémicos, al menos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Los

animales de los grupos satélite no se aparean y, por consiguiente, no se utilizan para la evaluación de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo.

Posología

28. Deben utilizarse generalmente como mínimo tres grupos de ensayo y un grupo testigo. Si no se dispone de datos generales apropiados sobre la toxicidad, puede realizarse un estudio (con animales de la misma cepa y procedencia) para ayudar a determinar las dosis que deben emplearse. A excepción de la administración del producto problema, los animales del grupo testigo deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para administrar el producto problema, el grupo testigo debe recibir el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.
29. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad y (toxico)cinética disponibles. También debe tenerse en cuenta que puede haber diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento evidente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos con la dosis inferior. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos y a menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis.
30. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre los parámetros sensibles endocrinos.

Ensayo límite

31. Si un estudio oral con una sola dosis de, al menos, 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración con los alimentos, de un porcentaje equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal), siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas del producto problema las que determinan la exposición máxima que puede alcanzarse.

Administración del producto problema

32. El producto problema se administra diariamente a los animales durante 7 días a la semana. Si el producto problema se administra por sonda, debe hacerse en una dosis única y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo con las diferentes dosis.
33. En el caso de productos problema administrados con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades administradas de producto problema no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando el producto problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe indicarse qué alternativa se ha seguido. Si el producto problema se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal. Cuando el estudio combinado se utilice como fase preliminar de un ensayo de toxicidad a largo plazo o de un estudio completo de toxicidad para la reproducción, en ambos estudios deberá utilizarse una dieta similar.

Calendario del experimento

34. La administración del producto a ambos sexos debe comenzar dos semanas antes del apareamiento, una vez que se han aclimatado durante al menos cinco días y las hembras han sido sometidas a cribado para confirmar que sus ciclos estrales son normales (en un período de dos semanas antes del tratamiento). El estudio debe programarse de tal manera que la evaluación del ciclo estral comience pronto después de que los animales hayan alcanzado la madurez sexual completa. Esto puede variar ligeramente según las diferentes cepas de ratas en distintos laboratorios; por ejemplo, en las ratas Sprague Dawley corresponde a 10 semanas de edad y en las ratas Wistar a unas 12 semanas de edad. Las madres con descendencia deben sacrificarse el día 13 después del parto, o poco después. A fin de permitir el ayuno desde la víspera de las madres antes de la recogida de sangre (si se prefiere esta opción), no es necesario dar muerte a las madres y a sus descendientes el mismo día. El día del nacimiento (es decir, cuando se completa el parto) se define como el día 0 después del parto. Las hembras que no presentan signos de apareamiento se sacrifican entre 24 y 26 días después del último día del período de apareamiento. Se continúa la administración del producto problema a los dos sexos durante el período de apareamiento. Los machos deben seguir recibiendo el producto problema después del período de apareamiento, al menos hasta que se haya completado el período mínimo total

de tratamiento de 28 días. A continuación se les da muerte o, alternativamente, se conservan y se les sigue administrando el producto para la posible realización de un segundo apareamiento si se considera adecuado.

35. La administración diaria del producto problema a las hembras parentales debe mantenerse a lo largo de toda la gestación y, como mínimo, hasta el día 13 después del parto o el día anterior al sacrificio, inclusive. En los estudios en que el producto problema se administre por inhalación o por vía cutánea, esta administración debe continuar como mínimo hasta el día 19 de la gestación, inclusive, y debe volver a iniciarse lo antes posible y, a más tardar, el día posnatal (DPN) 4.
36. No se aparean los animales del eventual grupo satélite previsto para las observaciones de seguimiento. Deben mantenerse al menos 14 días después del primer sacrificio programado de las madres, sin tratamiento alguno, para detectar la aparición retardada, la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.
37. En el apéndice 2 figura un diagrama del programa experimental.

Ciclos estrales

38. Deben supervisarse los ciclos estrales antes de que se inicie el tratamiento, a fin de seleccionar para el estudio las hembras con ciclos regulares (véase el punto 27). También hay que efectuar un seguimiento diario de los frotis vaginales desde el principio del período de tratamiento hasta que se observen signos de apareamiento. Si hay preocupación por que los efectos del estrés agudo puedan modificar los ciclos estrales con el inicio de la administración del producto, los laboratorios pueden exponer a los animales de ensayo durante 2 semanas, hacer a continuación frotis vaginales diarios para supervisar el ciclo estral durante un mínimo de dos semanas durante el período previo al apareamiento, y continuar la supervisión en el período de apareamiento hasta que haya signos de apareamiento. En el momento de la obtención de las células de la vagina o del cuello del útero, hay que tener cuidado para evitar la alteración de la mucosa, que podría provocar una pseudogestación (8) (9).

Procedimiento del apareamiento

39. Normalmente, en este estudio deben utilizarse apareamientos 1: 1 (un macho con una hembra). Pueden darse excepciones en caso de muertes ocasionales de machos. Se recomienda colocar a la hembra con el mismo macho hasta que se observen signos de apareamiento o hayan transcurrido dos semanas. Las hembras deben examinarse cada mañana para determinar la presencia de esperma o de tapón vaginal. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Si no ha tenido éxito el apareamiento, puede plantearse otro intento de aparear hembras con machos de comprobada capacidad reproductora del mismo grupo.

Tamaño de la camada

40. El día 4 después del nacimiento, podrá ajustarse el tamaño de cada camada eliminando las crías excedentarias mediante selección aleatoria con el fin de obtener, en la medida de lo posible, cuatro o cinco crías por sexo y por camada en función del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada. Se deben tomar muestras de sangre de dos de las crías excedentarias; tales muestras se mezclan y se utilizan para determinar los niveles de T4 en el suero. No es adecuado eliminar crías de forma selectiva, por ejemplo sobre la base del peso corporal o la distancia anogenital (DAG). Cuando el número de crías machos o hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro o cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras). No se eliminará ninguna cría cuando el tamaño de la camada descienda por debajo del objetivo de la eliminación (8 o 10 crías/camada). Si solo se dispone de una única cría por encima del objetivo de la eliminación, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.
41. Si no se ajusta el tamaño de la camada, se sacrifican dos crías por camada el día 4 después del nacimiento y se toman muestras de sangre para medir las concentraciones de la hormona tiroidea en el suero. Si es posible, las dos crías por camada deben ser hembras, a fin de reservar las crías macho para las evaluaciones del mantenimiento de pezones, salvo en caso de que la eliminación de estas crías no deje hembras suficientes para la evaluación en el momento del sacrificio. No se eliminarán las crías cuando el tamaño de la camada descienda por debajo de 8 o 10 crías/camada (dependiendo del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada). Si solo se dispone de una única cría por encima del tamaño normal de la camada, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

Observaciones

42. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se debe registrar el estado de salud de los animales. Se observan todos los animales al menos dos veces el día en relación con la morbilidad y la mortalidad.
43. Todos los animales parentales deben someterse a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y, después, al menos a una por semana. Estas observaciones deben hacerse fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y, de preferencia, a la misma hora cada día. Deben registrarse cuidadosamente, de preferencia con sistemas de puntuación definidos expresamente por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos observados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de

secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos), los partos prolongados o difíciles, o los comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (10).

44. En un momento del estudio, deben llevarse a cabo, en cinco machos y cinco hembras seleccionados aleatoriamente de cada grupo, una evaluación de la reactividad sensorial a estímulos de diferentes modalidades (p. ej., estímulos auditivos, visuales y propioceptivos) (8) (9) (11), una evaluación de la fuerza de prensión (12) y una evaluación de la actividad motriz (13). En las referencias respectivas se da más información sobre los procedimientos que pueden seguirse. Sin embargo, también pueden utilizarse procedimientos alternativos a los citados. En los machos, estas observaciones funcionales deben realizarse hacia el final del período de administración del producto, poco antes del sacrificio programado, pero antes del muestreo de sangre para hematología o bioquímica clínica (véanse los puntos 53-56, incluida la nota a pie de página 1). Las hembras deben estar en un estado fisiológico similar durante estas pruebas funcionales y deben someterse a ensayo preferentemente una vez durante la última semana de lactancia (p. ej. DL 6-13), poco antes del sacrificio programado. En la medida de lo posible, han de reducirse al mínimo los tiempos de separación de las madres y las crías.
45. Las observaciones funcionales realizadas una vez hacia la finalización del estudio pueden omitirse cuando el estudio se realice como estudio preliminar de un estudio posterior de toxicidad subcrónica (90 días) o a largo plazo. En este caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en este estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica o a largo plazo.
46. De forma excepcional, también pueden omitirse las observaciones funcionales en los grupos que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.
47. Debe registrarse la duración de la gestación y calcularse a partir del día 0 de la gestación. Cada camada debe examinarse lo antes posible después del parto para determinar el número y sexo de las crías, los mortinatos, los nacidos vivos y los nacidos con retraso evidente (crías que sean significativamente menores que las crías testigo correspondientes), y la presencia de anomalías macroscópicas.
48. Las crías vivas deben contarse y clasificarse por sexo, y las camadas pesarse dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Además de las observaciones sobre los animales parentales (véanse los

puntos 43 y 44), debe registrarse cualquier eventual comportamiento anómalo de la descendencia.

49. La distancia anogenital (DAG) de cada cría debe medirse el mismo día posnatal, entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe recogerse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (14). El número de pezones/areolas en las crías macho debe contarse el DPN 12 o 13, según lo recomendado en el documento de orientaciones GD 151 de la OCDE (15).

Peso corporal y consumo de alimento y agua

50. Los machos y las hembras deben pesarse el primer día de la administración del producto problema, después al menos una vez por semana, y en el momento del sacrificio. Durante la gestación, las hembras deben pesarse en los días 0, 7, 14 y 20 y dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Estas observaciones se registran respecto a cada animal adulto por separado.
51. Durante el período previo al apareamiento, la gestación y la lactancia, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. La medición del consumo de alimentos durante el apareamiento es opcional. El consumo de agua durante estos períodos también debe medirse si el producto problema se administra a través del agua de bebida.

Hematología

52. Una vez durante el estudio, deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos con cinco machos y cinco hembras seleccionados aleatoriamente de cada grupo: hematocrito, concentraciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos, reticulocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea. Si se sabe o sospecha que el producto problema o sus posibles metabolitos tienen propiedades oxidantes, habrá que determinar además la concentración de metahemoglobina y los corpúsculos de Heinz.
53. Las muestras de sangre deben tomarse de un sitio designado. Durante el muestreo, las hembras deben estar en un estado fisiológicamente similar. A fin de evitar dificultades prácticas relacionadas con la variabilidad en cuanto al principio de la gestación, la recogida de sangre de las hembras puede hacerse al final del período anterior al apareamiento como alternativa al muestreo justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales, o como parte de este. Las muestras de sangre de los machos deben tomarse preferentemente justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales, o como parte de este. Otra posibilidad es recoger la sangre de los machos al final del período previo a la apareamiento cuando se haya preferido este punto para las hembras.
54. Las muestras de sangre deben conservarse en condiciones adecuadas.

Bioquímica clínica

55. Las determinaciones de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos en los tejidos y, en concreto, en el riñón y el hígado, deben realizarse con muestras de sangre obtenidas de los cinco machos y cinco hembras seleccionados de cada grupo. Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras¹. Los parámetros medidos en el plasma o del suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina-transaminasa, aspartato-transaminasa y sorbitol-deshidrogenasa) y ácidos biliares. La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de la bilirrubina puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.
56. Se toman muestras de sangre de un lugar definido sobre la base del siguiente calendario:
- de al menos dos crías por camada el día 4 después del parto, si el número de crías lo permite (véanse los puntos 40-41),
 - de todas las madres y al menos dos crías por camada en el momento del sacrificio el día 13, y
 - de todos los machos adultos, en el momento del sacrificio.

Todas las muestras de sangre se conservan en condiciones adecuadas. Las muestras de sangre de las crías del día 13 y las de los machos adultos se evalúan en cuanto a los niveles de hormonas tiroideas en suero (T4). Si procede, se lleva a cabo una evaluación adicional de la T4 en las muestras de sangre de las madres y de las crías del día 4. Como opción pueden medirse otras hormonas si son pertinentes. La sangre de las crías puede ponerse en común por camadas para efectuar los análisis de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas (T4 y TSH) deben medirse preferentemente como “total”.

57. Pueden realizarse, con carácter opcional, las siguientes determinaciones en los análisis de orina de cinco machos seleccionados aleatoriamente de cada grupo durante la última

¹ El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, sin embargo, el ayuno desde la víspera puede interferir con el metabolismo general de los animales (gestantes), alterar el período y el comportamiento de la lactancia, y, en particular en estudios de alimentación, puede alterar la exposición diaria al producto problema. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse análisis de bioquímica clínica después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio en el caso de los machos. Las madres deben mantenerse un día más después de retirar las crías, por ejemplo el DPN 13). Las madres deben tenerse en ayunas durante una noche desde el día de lactancia 13-14 y la sangre final debe utilizarse para medir los parámetros de bioquímica clínica.

semana del estudio utilizando la recogida programada de orina; aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, contenido en proteínas, glucosa, sangre y glóbulos sanguíneos.

58. Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Entre las otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas del producto problema pueden afectar a las características metabólicas correspondientes se incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos en ayunas y glucosa en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Debe decidirse caso por caso si se procede a estas determinaciones.
59. Los siguientes factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:
- el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,
 - el método de sacrificio, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,
 - los equipos de ensayo para la determinación de las hormonas, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.
60. Las muestras de plasma destinadas específicamente a la determinación de las hormonas deben obtenerse a una hora comparable del día. Las cifras obtenidas al analizar las concentraciones de hormonas varían con los equipos comerciales de ensayo que se usan para el análisis.
61. 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 o, preferentemente, con un conjunto de animales no incluidos en los grupos experimentales. En el caso de las hembras, los datos deben ser de animales lactantes.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

62. Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales adultos empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Se debe prestar especial atención a los órganos sexuales. Debe registrarse el número de puntos de implantación. Deben examinarse frotis vaginales en el día de la autopsia para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con el examen histopatológico de los sexuales femeninos.

63. Los testículos y epidídimos, así como la próstata y las vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, de todos los machos adultos deben limpiarse de los tejidos adherentes, según proceda, y su peso húmedo debe tomarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Además, el peso de órganos opcionales podría incluir el complejo de músculo elevador del ano y el músculo bulbocavernoso, las glándulas de Cowper y el glande del pene en los machos y los ovarios emparejados (peso húmedo) y el útero (incluido el cuello) en las hembras; si se incluyen, estos pesos deben recogerse lo antes posible tras la disección. Deben conservarse los ovarios, testículos, epidídimos, órganos sexuales secundarios y todos los órganos que muestren lesiones macroscópicas de todos los animales adultos.
64. Deben conservarse en el medio de fijación más adecuado para el examen histopatológico posterior previsto las glándulas tiroideas de todos los adultos machos y hembras y de una cría macho y una cría hembra del día 13 de cada camada. El peso de la glándula tiroidea puede determinarse después de su fijación. Su disección debe hacerse también de manera muy cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares. Los daños tisulares podrían comprometer el examen histopatológico. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales (o como parte de este procedimiento), y conservarse en condiciones adecuadas (véase el punto 56).
65. Además, en el caso de un mínimo de cinco machos y hembras adultos, seleccionados aleatoriamente entre cada grupo (aparte de los moribundos o sacrificados antes de la terminación del estudio), el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el timo, el bazo, el encéfalo y el corazón deben limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y debe medirse su peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico posterior previsto: todas las lesiones macroscópicas, el encéfalo (regiones representativas, incluidos el cerebro, el cerebelo y la protuberancia), la médula espinal, los ojos, el estómago, el intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el bazo, el corazón, el timo, la tráquea y los pulmones (conservados mediante distensión pulmonar con fijador y después inmersión), las gónadas (testículos y ovarios), los órganos sexuales secundarios (útero con el cuello, epidídimos, próstata, vesículas seminales más glándulas coagulantes), la vagina, la vejiga urinaria, los ganglios linfáticos [además del ganglio de drenaje más proximal, debe tomarse otro ganglio linfático según la experiencia del laboratorio (16)], un nervio periférico (ciático o tibial) preferentemente muy próximo al músculo, músculo esquelético y hueso, con médula ósea (una sección o, como alternativa, un aspirado de médula ósea recién montado). Se recomienda fijar los testículos mediante inmersión en fijador de Bouin o en fijador de Davidson modificado (16) (17) (18); no se recomienda para estos tejidos la fijación con formol. Con una aguja se puede puncionar suave y superficialmente la túnica albugínea por

ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema.

66. Los siguientes tejidos pueden proporcionar valiosas indicaciones sobre los efectos de carácter endocrino: gónadas (ovarios y testículos), órganos sexuales secundarios (útero con el cuello, epidídimos, vesículas seminales con glándulas coagulantes, próstata dorsolateral y ventral), vagina, hipófisis, glándula mamaria y glándula suprarrenal. Las alteraciones de las glándulas mamarias de machos no se han documentado suficientemente, pero este parámetro puede ser muy sensible a las sustancias dotadas de actividad estrogénica. La observación de órganos/tejidos que no se enumeran en el punto 65 es opcional.
67. Las crías muertas y las crías sacrificadas el día 13 después del parto, o poco después, deben, al menos, ser examinadas externamente de forma detenida para detectar la eventual presencia de anomalías macroscópicas. Debe prestarse especial atención a los órganos genitales externos, en los que debe estudiarse la eventual presencia de signos de alteración en el desarrollo.

Examen histopatológico

68. Es preciso realizar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de los animales seleccionados en los grupos testigo y tratados con la dosis más elevada (haciendo especial hincapié en las fases de la espermatogénesis en las gónadas masculinas y en la histopatología de la estructura de las células intersticiales de los testículos). En caso necesario, podrán examinarse la glándula tiroidea de las crías y de los animales adultos restantes. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el grupo con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de otros grupos tratados. El documento de orientación sobre histopatología (10) proporciona más información acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.
69. Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas. Para contribuir a la determinación de los NOAEL, deben examinarse los órganos diana en otros grupos tratados, especialmente en los grupos de los que se alega que muestran un NOAEL.
70. Si se utiliza un grupo satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos señalados por presentar efectos en los grupos tratados.

DATOS E INFORME

Datos

71. Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, todos los datos deben resumirse en forma de cuadro que recoja, respecto a cada grupo de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o del sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada. En el apéndice 3 figura un modelo de informe resumido en forma de cuadro, que ha demostrado ser muy útil para la evaluación de los efectos sobre la reproducción y el desarrollo.
72. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La comparación del efecto a lo largo de un intervalo de dosis debe evitar el uso de múltiples pruebas t. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio. El análisis estadístico de la DAG y del mantenimiento de pezones debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta los efectos de camada. Cuando proceda, la camada es la unidad de análisis. El análisis estadístico del peso corporal de las crías debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta el tamaño de la camada. Debido a las dimensiones limitadas del estudio, los análisis estadísticos en forma de ensayos de “significación” tienen un valor limitado respecto a muchos parámetros, especialmente a los de la reproducción. Son inadecuados algunos de los métodos más utilizados, especialmente los ensayos paramétricos con medidas de tendencia central. Si se utilizan análisis estadísticos, entonces el método elegido debe ser apropiado para la distribución de la variable examinada y ser seleccionado antes de que se inicie el estudio.

Evaluación de los resultados

73. Los resultados de este estudio de toxicidad deben evaluarse en términos de efectos observados, autopsia y resultados microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación entre la dosis de producto problema y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, esterilidad, anomalías clínicas, alteración del comportamiento reproductor y con la prole, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.
74. Debido al breve período de tratamiento de los machos, el examen histopatológico de los testículos y epidídimos debe tenerse en cuenta junto con los datos de fertilidad, al evaluar los efectos para la reproducción masculina. También puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio el uso de datos de controles históricos sobre reproducción o desarrollo (por ejemplo, en cuanto al tamaño de la camada, DAG, mantenimiento de pezones, niveles séricos de T4), cuando se disponga de ellos.

75. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar datos de controles históricos y calcular coeficientes de variación de los datos numéricos, especialmente en cuanto a los parámetros relacionados con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

Informe del ensayo

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

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;
- estabilidad del producto problema, si se conoce.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Vehículo (si procede):

- Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales de ensayo:

- especie y cepa empleada;
- número, edad y sexo de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo;
- justificación de la especie si es distinta de la rata.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la selección de las dosis;
- datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;

- datos sobre la administración del producto problema;
- factor de conversión de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua;
- descripción detallada del procedimiento de aleatorización de la selección de crías para el sacrificio, en su caso.

Resultados:

- peso corporal y variaciones del mismo;
- consumo de alimentos y de agua, si se ha medido;
- datos de la respuesta tóxica por sexo y dosis, incluida la fertilidad, la gestación y cualquier otro signo de
- toxicidad;
- duración de la gestación;
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la descendencia, el crecimiento postnatal, etc.;
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no);
- evaluación de la actividad sensorial, de la fuerza de prensión y de la actividad motriz;
- pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia;
- pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia;
- número de hembras adultas con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;
- número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias;
- número de crías con anomalías visibles macroscópicamente; evaluación macroscópica de los genitales externos, número de nacidos con retraso evidente;
- momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;
- número de implantes, tamaño de la camada y pesos de la camada en el momento del registro;
- datos sobre el peso corporal de las crías;
- DAG de todas las crías (y peso corporal el día de la medición de la DAG);
- mantenimiento de pezones en las crías macho;
- niveles de la hormona tiroidea, en machos adultos y crías el día 13 (y madres y crías el día 4 si se miden);

- peso corporal en el momento del sacrificio y peso de los órganos de los animales parentales;
- observaciones de la autopsia;
- descripción detallada de los hallazgos histopatológicos;
- datos relativos a la absorción (si procede);
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

Interpretación de los resultados

77. El estudio pretende evaluar la toxicidad para la reproducción o el desarrollo relacionada con la administración continuada de dosis. En particular, dado que el estudio se centra en parámetros tanto de toxicidad general como de toxicidad para la reproducción y el desarrollo, los resultados deben permitir distinguir los efectos sobre la reproducción y el desarrollo que se producen en ausencia de toxicidad general, frente a los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para los animales parentales (véanse los puntos 7-11). Podría dar una indicación de la necesidad de realizar nuevas investigaciones y proporcionar orientaciones para el diseño de estudios posteriores. Debe consultarse el documento de orientación n.º 43 de la OCDE para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de toxicidad para la reproducción y el desarrollo (19). El documento de orientación n.º 106 de la OCDE sobre la evaluación histológica de los ensayos endocrinos y de reproducción en roedores (16) proporciona información sobre la preparación y evaluación de los órganos (endocrinos) y los frotis vaginales que puede ser útil para el presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (16) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (No 43), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

Apéndice 1

DEFINICIONES (VÉASE TAMBIÉN EL DOCUMENTO DE ORIENTACIONES GD 150 DE LA OCDE) (20)

Androgenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17 β -estradiol) en el organismo de un mamífero.

Actividad antitiroidea: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Producto: Sustancia o mezcla.

Toxicidad para el desarrollo: Manifestación de la toxicidad para la reproducción que consiste en la presencia de trastornos pre-, peri- y posnatales, de tipo estructural o funcional, en la descendencia.

Dosis: Cantidad de producto problema administrada. La dosis se expresa en peso del producto problema por unidad de peso corporal de animal de ensayo y día (p. ej., mg/kg peso corporal/día), o como concentración alimentaria constante.

Posología: Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

Toxicidad evidente: Término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de un producto problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y tales que, ante un aumento de la dosis administrada, quepa esperar como resultado la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Disminución de la fertilidad: Trastornos en la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras o de los machos.

Toxicidad para la madre: Efectos adversos en las hembras gestantes, tanto si se producen de forma específica (efecto directo) como inespecífica (efecto indirecto) y relacionados con la gestación.

NOAEL: Abreviatura en inglés de nivel sin efectos adversos observados (*no-observed-adverse effect level*). Se trata de la dosis más elevada a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

Estrogenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17 β -estradiol) en el organismo de un mamífero.

Toxicidad para la reproducción: Efectos nocivos para la descendencia y/o disminución de la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras y de los machos.

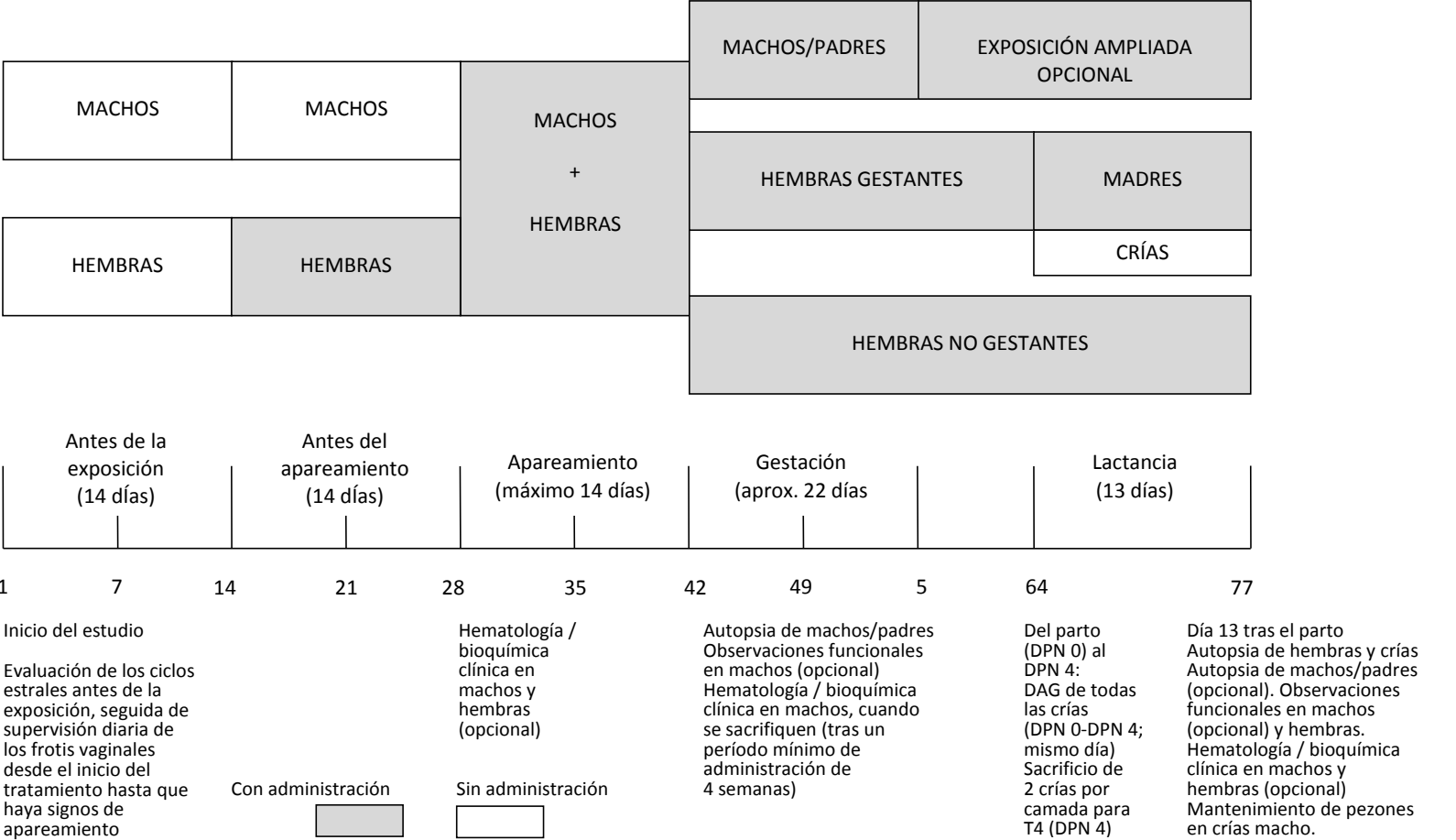
Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

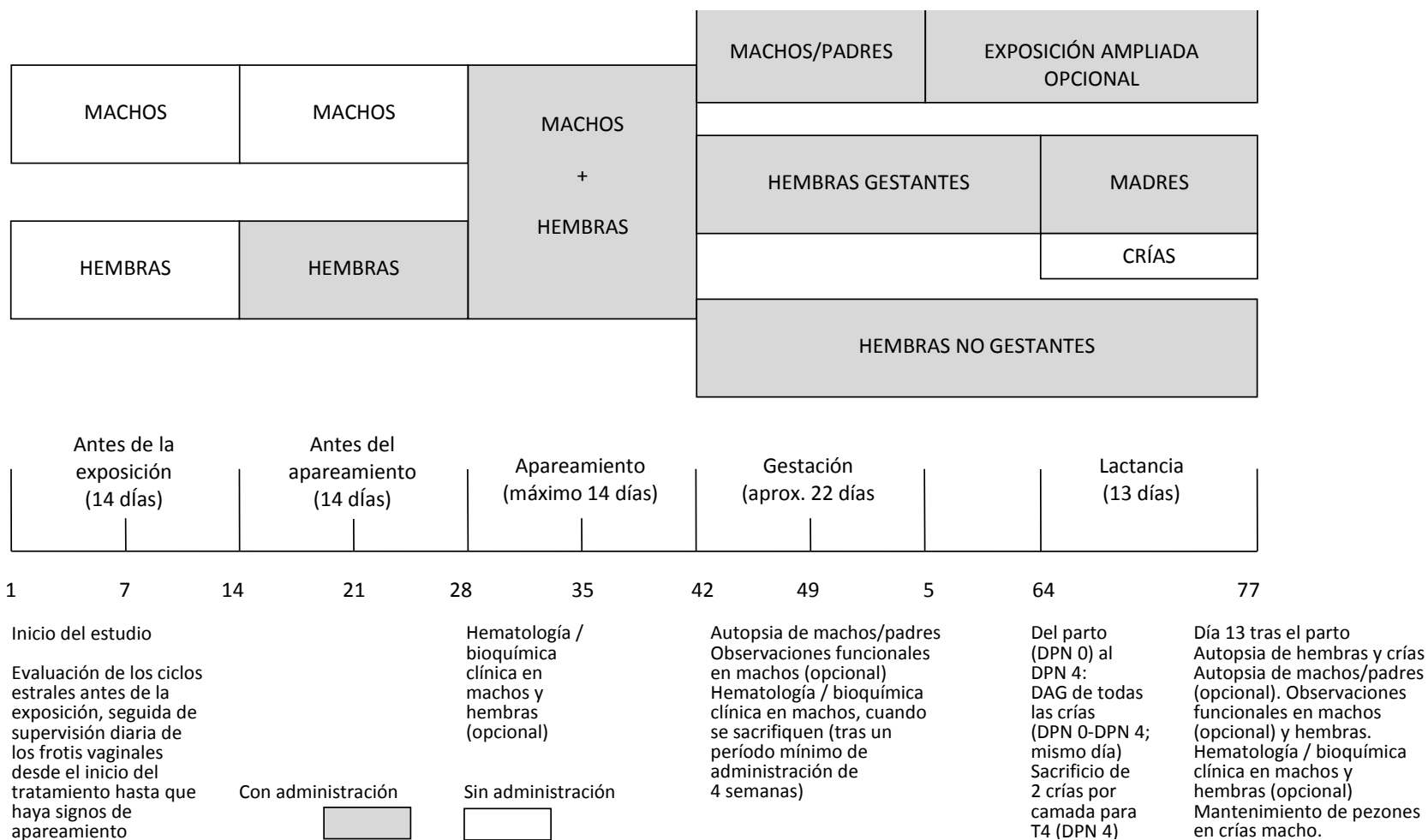
Actividad tiroidea: Capacidad de un producto para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Validación: Procedimiento científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

Apéndice 2

DIAGRAMA DEL PROGRAMA EXPERIMENTAL CON INDICACIÓN DE LA DURACIÓN MÁXIMA DEL ESTUDIO, SOBRE LA BASE DE UN PERÍODO DE APAREAMIENTO COMPLETO DE CATORCE DÍAS





Apéndice 3

INFORME RESUMIDO EN FORMA DE CUADRO SOBRE LOS EFECTOS PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

OBSERVACIONES	VALORES				
Dosis (unidades)	0 (testigo)	...	...	...	...
Parejas al inicio (N)					
Ciclo estral (por lo menos, longitud media y frecuencia de los ciclos irregulares)					
Hembras que presentan signos de cópula (N)					
Hembras que llegan a la gestación (N)					
Días de concepción 1-5 (N)					
Días de concepción 6-... ⁽¹⁾ (N)					
Gestación ≤ 21 días (N)					
Gestación = 22 días (N)					
Gestación ≥ 23 días (N)					
Madres con crías nacidas vivas (N)					
Madres con crías vivas el día 4 después del parto (N)					
Implantes/madre (media)					
Crías vivas/madre en el momento del nacimiento (media)					
Crías vivas/madre el día 4 (media)					
Proporción de sexos (m/f) en el momento del nacimiento (media)					
Proporción de sexos (m/f) el día 4 (media)					
Peso de la camada al nacer (media)					
Peso de la camada el día 4 (media)					
Peso de las crías al nacer (media)					
Peso de las crías en el momento de la medición de la DAG (media de los machos, media de las hembras)					
DAG de las crías en el mismo día posnatal, nacimiento – día 4 (media de los machos, media de las hembras, indíquese el DPN)					
Peso de las crías el día 4 (media)					
Peso de las crías el día 13 (media)					
Mantenimiento de pezones en las crías macho al día 13 (media)					
CRÍAS ANÓMALAS					
Madres con 0					

¹⁾ Último día del período de apareamiento.

Madres con 1					
Madres con ≥ 2					
PÉRDIDA DE DESCENDENCIA					
Prenatal (implantes menos nacimientos vivos)					
Hembras con 0					
Hembras con 1					
Hembras con 2					
Hembras con ≥ 3					
Posnatal (nacidos vivos menos vivos el día 13 posnatal)					
Hembras con 0					
Hembras con 1					
Hembras con 2					
Hembras con ≥ 3					

B.65. MÉTODO DE ENSAYO *IN VITRO* CON BARRERA DE MEMBRANA PARA EVALUAR LA CORROSIÓN CUTÁNEA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 435 de la OCDE (2015). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹. El presente método de ensayo, que es equivalente a las directrices de ensayo TG 435 actualizadas de la OCDE, proporciona un método de ensayo con barrera de membrana que puede utilizarse para identificar los productos corrosivos. El método de ensayo utiliza una membrana artificial diseñada para responder a productos corrosivos de forma similar a la piel animal *in situ*.
2. Tradicionalmente, la corrosividad cutánea se ha evaluado aplicando el producto problema a la piel de animales vivos y evaluando el alcance de los daños tisulares tras un período de tiempo determinado (2). Además del presente método de ensayo, se han adoptado otros métodos de ensayo *in vitro* como alternativas (3) (4) al procedimiento normal de piel de conejo *in vivo* (capítulo B.4 del presente anexo, equivalente a las TG 404 de la OCDE) utilizado para identificar productos corrosivos (2). La estrategia escalonada de ensayo y valoración del SGA de las Naciones Unidas para la evaluación y clasificación de la corrosividad cutánea y el documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) en relación con la irritación y la corrosión cutáneas recomiendan utilizar métodos de ensayo *in vitro* validados y aceptados con arreglo a los módulos 3 y 4 (1) (5).. Los IATA describen varios módulos que agrupan las fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aportan orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) proponen un enfoque cuando se precisan más ensayos (5). En este enfoque modular, los resultados positivos de métodos de ensayo *in vitro* pueden utilizarse para clasificar

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.008, p. 1).

un producto como corrosivo sin necesidad de realizar ensayos con animales, reduciendo así y afinando el uso de animales y evitando el dolor y la angustia que podrían producirse si se utilizaran animales para este fin.

3. Se han realizado estudios de validación para el modelo de barrera de membrana *in vitro*, comercializado como Corrositex® (6)(7)(8), que muestra una exactitud general para predecir la corrosividad cutánea del 79 % (128/163), una sensibilidad del 85 % (76/89), y una especificidad del 70 % (52/74) con una base de datos de 163 sustancias y mezclas (7). Sobre la base de su validez reconocida, se ha recomendado la utilización de este método de referencia validado (MRV) como parte de una estrategia escalonada de ensayos para evaluar el peligro potencial de corrosión cutánea de los productos (5) (7). Antes de que pueda utilizarse con fines normativos un modelo de barrera de membrana *in vitro* de evaluación de la corrosión cutánea, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con el MRV (9), de acuerdo con las normas de comportamiento predefinidas (10). La aceptación mutua de datos por la OCDE solo se garantizará después de que se hayan revisado e incluido en las directrices de ensayo equivalentes de la OCDE los eventuales métodos nuevos o actualizados propuestos que sigan las normas de comportamiento. En la actualidad, solo uno de los métodos *in vitro* está cubierto por las directrices de ensayo 435 de la OCDE y el presente método de ensayo, el modelo comercializado Corrositex®.
4. Otros métodos de ensayo para la evaluación de la corrosividad cutánea se basan en la utilización de piel humana reconstituida (TG 431 de la OCDE) (3) y de piel de rata aislada (TG 430 de la OCDE) (4). Las presentes directrices de ensayo contemplan también la subcategorización de los productos corrosivos en las tres subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas y los tres grupos de embalaje para el transporte de las Naciones Unidas en cuanto al peligro de corrosividad. Las directrices de ensayo se adoptaron originalmente en 2006 y se actualizaron en 2015 para referirse al documento de orientación sobre los IATA y actualizar la lista de sustancias para la prueba de la competencia.

DEFINICIONES

5. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

6. El ensayo descrito en este método de ensayo permite la identificación de productos problema corrosivos y permite la subcategorización de los productos problema

corrosivos según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP (cuadro 1). Además, un método de ensayo de este tipo puede utilizarse para tomar decisiones sobre la corrosividad y la no corrosividad de determinadas clases de productos como, por ejemplo, ácidos orgánicos e inorgánicos, derivados de ácidos¹, y bases a efectos de determinados ensayos relacionados con el transporte (7) (11) (12). El presente método de ensayo describe un procedimiento genérico similar al método de ensayo de referencia validado (7). Aunque el presente método no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) aborda específicamente el aspecto de la irritación cutánea *in vitro* (13). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (5).

Cuadro 1: Categorías y subcategorías de corrosión cutánea del SGA de las Naciones Unidas (1)

Categoría de corrosivo (categoría 1) (en el caso de las autoridades que no utilizan subcategorías)	Posibles subcategorías de corrosivo ² (en el caso de las autoridades que utilizan subcategorías, incluido el Reglamento CLP)	Corrosivo en ≥ 1 de 3 animales	
		Tiempo de exposición	Observación
Corrosivo	Corrosivo de subcategoría 1A	≤ 3 minutos	≤ 1 hora
	Corrosivo de subcategoría 1B	> 3 minutos / ≤ 1 hora	≤ 14 días
	Corrosivo de subcategoría 1C	> 1 hora / ≤ 4 horas	≤ 14 días

- Una limitación del método de referencia validado (7) es que muchos productos no corrosivos y algunos productos corrosivos no pueden someterse a ensayo, sobre la base de los resultados del ensayo de compatibilidad inicial (véase el punto 13). Los productos acuosos con un pH comprendido entre 4,5 y 8,5 a menudo no cumplen las condiciones para someterse a ensayo; sin embargo, el 85 % de los productos sometidos a ensayo en este intervalo de pH no eran corrosivos, en los ensayos con

¹ “Derivados de ácidos” es una denominación de clase inespecífica y se define en términos generales como un producto obtenido a partir de un ácido, bien directamente, bien por modificación o bien mediante sustitución parcial. Esta clase comprende los anhídridos, los ácidos halogenados, las sales y otros tipos de productos.

² En el caso de la UE, el Reglamento CLP aplica las tres subcategorías de corrosión cutánea 1A, 1B y 1C.

animales (7). El método con barrera de membrana *in vitro* puede utilizarse para el ensayo de sólidos (solubles o insolubles en agua), líquidos (acuosos o no acuosos) y emulsiones. Sin embargo, los productos problema que no provocan un cambio detectable en el ensayo de compatibilidad (es decir, cambio de color en el sistema de detección del producto que tiene el método de ensayo de referencia validado) no pueden someterse a ensayo utilizando el método con barrera de membrana y deben ensayarse utilizando otros métodos de ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El sistema de ensayo consta de dos componentes: una biobarrera macromolecular sintética y un sistema de detección del producto (CDS); este método de ensayo detecta, a través del CDS, el daño causado en la barrera de membrana por los productos problema corrosivos tras la aplicación del producto problema en la superficie de la barrera de membrana macromolecular sintética (7), presumiblemente por el mismo mecanismo o mecanismos de corrosión que funcionan en la piel viva.
9. La penetración a través de la barrera de membrana (o perforación) podría medirse por varios procedimientos o CDS, incluido un cambio en el color de un colorante indicador de pH o en alguna otra propiedad de la solución indicadora situada por debajo de la barrera.
10. Debe confirmarse que la barrera de membrana es válida, es decir, que es pertinente y fiable para el uso previsto. Esto incluye garantizar que diferentes preparados son constantes con respecto a las propiedades de la barrera como, por ejemplo, que son capaces de mantener una barrera frente a los productos no corrosivos, para poder clasificar las propiedades corrosivas de los productos en las diversas subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas (1). La clasificación asignada se basa en el tiempo que tarda un producto en penetrar a través de la barrera de membrana hasta llegar a la solución indicadora.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

11. Antes de proceder al uso sistemático del método con barrera de membrana *in vitro*, según el presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recomendadas en el cuadro 2. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (10)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

Cuadro 2: Sustancias para la prueba de la competencia¹

Sustancia ²	N.º CAS	Clase química	Subcategoría	Subcategoría

			del SGA de las Naciones Unidas <i>in vivo</i>³	del SGA de las Naciones Unidas <i>in vitro</i>³
Trifluoruro de boro dihidratado	13319-75-0	Ácidos inorgánicos	1A	1A
Ácido nítrico	7697-37-2	Ácidos inorgánicos	1A	1A
Pentacloruro de fósforo	10026-13-8	Precursores de ácidos inorgánicos	1A	1A
Cloruro de valerilo	638-29-9	Cloruros de ácidos	1B	1B
Hidróxido de sodio	1310-73-2	Bases inorgánicas	1B	1B
1-(2-Aminoetil)piperazina	140-31-8	Aminas alifáticas	1B	1B
Cloruro de bencenosulfonilo	98-09-9	Cloruros de ácidos	1C	1C
N,N-Dimetilbencilamina	103-83-3	Anilinas	1C	1C
Tetraetilen-pentaamina	112-57-2	Aminas alifáticas	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoles	NC	NC
Acrilato de nonilo	2664-55-3	Acrilatos/metacrilatos	NC	NC
Bicarbonato de sodio	144-55-8	Sales inorgánicas	NC	NC

¹ Entre las doce sustancias enumeradas más arriba se incluyen tres sustancias de cada una de las tres subcategorías del SGA de las Naciones Unidas de sustancias corrosivas y tres sustancias no corrosivas, están disponibles fácilmente en los proveedores comerciales, y la subcategoría del SGA de las Naciones Unidas se basa en los resultados de ensayos *in vivo* de alta calidad. Estas sustancias proceden de la lista de 40 sustancias de referencia incluidas en la lista mínima de productos identificados para demostrar la exactitud y fiabilidad de los métodos de ensayo que son estructural y funcionalmente similares al método de ensayo de referencia validado, y han sido seleccionadas de entre los 163 productos de referencia que se utilizaron originalmente para validar el método de ensayo de referencia (Corrositex[®]) (7) (10) (14). El objetivo de este proceso de selección era incluir, en la medida de lo posible, productos que: son representativos de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., productos no corrosivos; corrosivos de los grupos de embalaje I, II y III de las Naciones Unidas) que el método de referencia validado es capaz de medir o predecir; son representativos de las clases químicas utilizadas en los estudios de validación; tienen estructuras químicas bien definidas; inducen resultados reproducibles con el método de ensayo de referencia validado; inducen resultados definitivos en el ensayo de referencia *in vivo*; se encuentran disponibles en el comercio; y no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos (14).

² Sustancias de las que se ha comprobado que no están mezcladas o que tienen una pureza $\geq 90\%$

³ Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y el CLP. NC: No corrosivo.

PROCEDIMIENTO

12. En los puntos siguientes se describen los componentes y procedimientos de un método de ensayo con barrera de membrana artificial para la evaluación de la corrosividad (7) (15), basado en el MRV actual, es decir, el método Corrositex[®] disponible en el comercio. La barrera de membrana y la solución indicadora / de compatibilidad, así como la de categorización, pueden construirse, prepararse u obtenerse en el comercio, como sucede con el MRV, Corrositex[®]. Se dispone de un protocolo de método de ensayo de muestras para el método de ensayo de referencia validado (7). Los ensayos deben realizarse a temperatura ambiente (17-25 °C) y los componentes deben cumplir las siguientes condiciones.

Ensayo de compatibilidad con el producto problema

13. Antes de realizar el ensayo con barrera de membrana, se realiza un ensayo de compatibilidad para determinar si el producto problema es detectable por el CDS. Si el CDS no detecta el producto problema, el método de ensayo con barrera de membrana no es adecuado para evaluar la posible corrosividad del producto problema y debe utilizarse otro método de ensayo diferente. El CDS y las condiciones de exposición utilizadas en el ensayo de compatibilidad deben reflejar la exposición en el subsiguiente ensayo con barrera de membrana.

Ensayo de categoría del producto problema según la escala temporal

14. Si es apropiado para el método de ensayo, el producto problema que haya pasado con éxito el ensayo de compatibilidad debe someterse a un ensayo de categoría según la escala temporal, es decir, a una prueba de cribado para distinguir entre ácidos o bases débiles y fuertes. Por ejemplo, en el método de ensayo de referencia validado se utiliza un ensayo de categorización según la escala temporal para indicar cuál de las dos escalas temporales debe utilizarse basándose en si se detecta una reserva ácida o alcalina significativa. Deben utilizarse dos escalas temporales diferentes de la perforación para determinar la corrosividad y la subcategoría de corrosividad cutánea del SGA de las Naciones Unidas, sobre la base de la reserva ácida o alcalina del producto problema.

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO CON BARRERA DE MEMBRANA

Barrera de membrana

15. La barrera de membrana consta de dos componentes: un gel acuoso macromolecular proteínico y una membrana permeable de soporte. El gel proteínico debe ser impermeable a los líquidos y sólidos, pero puede corroerse y hacerse permeable. La barrera de membrana totalmente construida debe conservarse en condiciones predeterminadas de las que se haya confirmado que impiden el deterioro del gel por fenómenos como, por ejemplo, secado, crecimiento microbiano, deslizamiento o cuarteado, que podrían afectar a su comportamiento. Debe determinarse el período de conservación aceptable, tras el que no se podrán utilizar los preparados de barrera de membrana.

16. La membrana permeable de soporte proporciona apoyo mecánico al gel proteínico durante el proceso de gelificación y la exposición al producto problema. La membrana de soporte debe evitar que el gel se ablande o se deslice, y ha de ser fácilmente permeable a todos los productos problema.
17. El gel proteínico, compuesto de proteínas como, por ejemplo, queratina, colágeno o mezclas de proteínas, que forman una matriz de gel, sirve como diana del producto problema. El material proteínico se coloca en la superficie de la membrana de soporte y se deja que gelifique antes de colocar la barrera de membrana encima de la solución indicadora. El gel proteínico debe tener por todos sitios el mismo espesor y la misma densidad, sin burbujas de aire ni defectos que puedan afectar a su integridad funcional.

Sistema de detección del producto (CDS)

18. La solución indicadora, que es la misma solución utilizada en el ensayo de compatibilidad, debe responder a la presencia de una producto problema. Debe utilizarse un colorante (o una combinación de colorantes) indicador de pH como, por ejemplo, rojo del cresol y naranja de metilo, que muestre un cambio de color en respuesta a la presencia del producto problema. El sistema de medición puede ser visual o electrónico.
19. Los sistemas de detección que se hayan elaborado para detectar el paso del producto problema a través de la membrana de barrera deben evaluarse en cuanto a su pertinencia y fiabilidad, a fin de demostrar la gama de productos que pueden detectarse y los límites cuantitativos de su detección.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Conjunto de los componentes del método de ensayo

20. La barrera de membrana se coloca en un frasco (o en un tubo) que contenga la solución indicadora, de forma que la membrana de soporte esté en pleno contacto con la solución indicadora y no haya presencia de burbujas de aire. Debe velarse por que se mantenga la integridad de la barrera.

Aplicación del producto problema

21. Una cantidad adecuada del producto problema, por ejemplo 500 µl de un líquido o 500 mg de un sólido en polvo fino (7) se pone con cuidado en una capa por encima de la superficie superior de la barrera de membrana y se distribuye uniformemente. Se prepara un número adecuado de réplicas, por ejemplo cuatro (7), para cada producto problema y los testigos correspondientes (véanse los puntos 23 a 25). Se registra el momento de aplicación del producto problema a la barrera de membrana. Para garantizar que los tiempos de corrosión cortos se registran exactamente, se escalonan los tiempos de aplicación del producto problema a los frascos replicados.

Medición de la penetración en las barreras de las membranas

22. Cada frasco se controla adecuadamente, y se registra el tiempo del primer cambio de la solución indicadora, es decir, la penetración a través de la barrera, y se determina el tiempo transcurrido entre la aplicación y la penetración a través de la barrera de membrana.

Testigos

23. En los ensayos que impliquen el uso de un vehículo o disolvente con el producto problema, el vehículo o disolvente debe ser compatible con el sistema de barrera de membrana, es decir, no alterar la integridad del sistema de barrera de membrana, y no alterar la corrosividad del producto problema. Si procede, el control del disolvente (o del vehículo) debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema para demostrar la compatibilidad del disolvente con el sistema de barrera de membrana.
24. Un testigo positivo (corrosivo) con una actividad de corrosividad intermedia, por ejemplo 110 ± 15 mg de hidróxido de sodio (corrosivo de la categoría 1B del SGA de las Naciones Unidas) (7), debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema para evaluar si el sistema de ensayo se comporta de manera aceptable. Un segundo testigo positivo que sea de la misma clase química que el producto problema puede resultar útil para evaluar el potencial relativo de corrosividad de un producto problema corrosivo. Deben seleccionarse uno o más testigos positivos que sean intermedios en su corrosividad (por ejemplo, de la subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas) a fin de detectar eventuales cambios en el tiempo de penetración que puedan ser inaceptablemente superiores o inferiores al valor de referencia establecido, lo que indicaría que el sistema de ensayo no funciona correctamente. Con este fin, son de utilidad limitada los productos extremadamente corrosivos (de la subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas) o no corrosivos. Un producto corrosivo de la subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas permitiría detectar un tiempo de perforación demasiado corto o demasiado largo. Un producto ligeramente corrosivo (de la subcategoría 1C del SGA de las Naciones Unidas) podría utilizarse como testigo positivo a fin de medir la capacidad del método de ensayo para distinguir sistemáticamente entre productos débilmente corrosivos y no corrosivos. Independientemente del enfoque utilizado, debe elaborarse un intervalo de respuesta aceptable de los testigos positivos sobre la base del intervalo histórico de los tiempos de perforación de los testigos positivos empleados, como la media ± 2 -3 desviaciones típicas. En cada estudio debe determinarse el tiempo exacto de perforación correspondiente al testigo positivo, de forma que puedan detectarse las desviaciones fuera del intervalo aceptable.
25. También debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema un testigo negativo (no corrosivo) como, por ejemplo, ácido cítrico al 10 % o ácido propiónico al 6 % (7), como otra medida de control de la calidad para demostrar la integridad funcional de la barrera de membrana.

Criterios de aceptabilidad del estudio

26. Según los parámetros temporales establecidos para cada una de las subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas, el tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación de un producto problema a la barrera de membrana y la penetración a través de la barrera se utiliza para predecir la corrosividad del producto problema. Para que un estudio se considere aceptable, el testigo positivo en paralelo debe dar el tiempo previsto de respuesta a la penetración (por ejemplo, un tiempo de perforación de 8-16 minutos si se utiliza el hidróxido sódico como testigo positivo), el testigo negativo en paralelo no debe ser corrosivo y, cuando se incluye, el control del disolvente en paralelo no debe ser corrosivo ni alterar el potencial de corrosividad del producto problema. Antes de proceder al uso sistemático de un método que se ajuste al presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las doce sustancias recomendadas en el cuadro 2. En el caso de los nuevos métodos «de imitación» elaborados en el marco del presente método de ensayo que son estructural y funcionalmente similares al método de referencia validado (14), deben utilizarse las normas de comportamiento predefinidas para demostrar la fiabilidad y exactitud del nuevo método antes de su uso en pruebas normativas (10).

Interpretación de los resultados y clasificación de la corrosividad de los productos problema

27. El tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación del producto problema a la barrera de membrana y la penetración a través de esta se utiliza para clasificar el producto problema en términos de subcategorías de corrosión del SGA de las Naciones Unidas (1) y, si procede, de grupos de embalaje de las Naciones Unidas (16). Se establecen para cada método de ensayo propuesto unos valores umbral de tiempo correspondientes a cada una de las tres subcategorías de corrosión. Las decisiones finales sobre los tiempos umbral deben considerar la necesidad de minimizar la subclasificación del peligro corrosivo (es decir, los falsos negativos). En las presentes directrices de ensayo, deben utilizarse los tiempos umbral de Corrositex®, descritos en el cuadro 3, ya que representa el único método de ensayo que actualmente se ajusta a las directrices de ensayo (7).

Cuadro 3: Modelo de predicción de Corrositex®

Tiempo medio de perforación (min.)		Predicción del SGA de las Naciones Unidas³
Productos problema de categoría 1¹ (determinados por el ensayo de categorización del método)	Productos problema de categoría 2² (determinados por el ensayo de categorización del método)	
0-3 min.	0-3 min.	Corrosivo Subcategoría optativa 1A
> 3 a 60 min.	> 3 a 30 min.	Corrosivo Subcategoría optativa 1B

> 60 a 240 min.	> 30 a 60 min.	Corrosivo Subcategoría optativa 1C
> 240 min.	> 60 min.	No corrosivo

¹ Productos problema con alta reserva ácida/alcalina (6)

² Productos problema con baja reserva ácida/alcalina (6)

³ Las subcategorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas corresponden respectivamente a los grupos de embalaje I, II y III de las Naciones Unidas.

DATOS E INFORME

Datos

28. El tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación y la penetración a través de la barrera del producto problema y del testigo o testigos positivos debe comunicarse en forma de cuadro con los datos de las distintas réplicas, así como la media $\pm$ la desviación típica de cada ensayo.

Informe del ensayo

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

Producto problema y sustancias testigo:

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;
- Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- Origen; número de lote, si está disponible;
- Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha de nuevo análisis, si se conoce;
- Condiciones de conservación.

Vehículo:

- Identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;
- Motivación de la elección del vehículo.

Modelo de barrera de membrana in vitro y protocolo utilizados, incluidas la exactitud y la fiabilidad demostradas

Condiciones de ensayo:

- Descripción del equipo y de los procedimientos de preparación utilizados;
- Origen y composición de la barrera de membrana *in vitro* utilizada;
- Composición y propiedades de la solución indicadora;
- Método de detección;
- Cantidades de producto problema y de sustancias testigo;
- Número de réplicas;
- Descripción y justificación del ensayo de categorización de la escala temporal;
- Método de aplicación;
- Tiempos de observación;
- Descripción de los criterios de evaluación y clasificación aplicados;
- Demostración de la competencia para la aplicación del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

Resultados:

- Cuadro de datos brutos individuales de las distintas muestras de producto problema y de testigo respecto a cada réplica;
- Descripción de otros efectos observados;
- Clasificación derivada con referencia al modelo de predicción o a los criterios de decisión utilizados.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html
- (2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.
- (3) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: método de ensayo con epidermis humana reconstruida (EHR).
- (4) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Resistencia eléctrica transcutánea (RET).
- (5) OCDE (2015): Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 37-45.
- (9) OCDE (2005): Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- (10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en:

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponible en: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponible en: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Naciones Unidas (2013). Recomendaciones de las Naciones Unidas relativas al transporte de mercancías peligrosas, Reglamentación modelo, 18.^a edición revisada (parte, capítulo 2.8), Naciones Unidas, 2013. Disponible en: <https://shop.un.org/es/series/recomendaciones-relativas-al-transporte-de-mercanc-peligrosas-reglamentaci-n-modelo>.

Apéndice

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (9).

Producto: Sustancia o mezcla.

Sistema de detección del producto (CDS): Sistema de medición visual o electrónico con una solución indicadora que responde a la presencia de un producto problema, por ejemplo mediante un cambio en un colorante (o una combinación de colorantes) indicador de pH que muestre un cambio de color en respuesta a la presencia del producto problema o mediante otros tipos de reacciones químicas o electroquímicas.

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “exactitud” se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (9).

SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos): Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

IATA: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

Mezcla: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el

resultado de una reacción química.

NC: No corrosivo.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (9).

Pertinencia: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (9).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (9).

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Corrosión cutánea *in vivo*: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

Especificidad: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

B.66. ENSAYOS *IN VITRO* DE TRANSACTIVACIÓN TRANSFECTADA ESTABLEMENTE PARA DETECTAR AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Directrices de ensayo de la OCDE sobre la base del comportamiento

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 455 de la OCDE (2016). Estas son unas directrices de ensayo basadas en el comportamiento (PBTG, *performance-based test guideline*), que describen la metodología de los ensayos *in vitro* de transactivación transfectada establemente para detectar agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (ensayos ER TA, *Estrogen Receptor Transactivation Assays*). Comprenden varios métodos de ensayo similares desde el punto de vista mecánico y funcional para la identificación de los agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (es decir, ER α , y/o ER β) y deben facilitar la elaboración de nuevos métodos de ensayo similares o modificados, de conformidad con los principios de validación expuestos en el documento de orientación de la OCDE sobre la validación y la aceptación internacional de métodos de ensayo nuevos o actualizados para la evaluación de peligros (*Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*) (1). Los métodos de ensayo de referencia plenamente validados (apéndice 2 y apéndice 3) que sirven de base a estas PBTG son los siguientes:
 - el ensayo de transactivación transfectada establemente (STTA, *Stably Transfected TA*) (2) con la línea celular (h) ER α -HeLa-9903; y
 - el ensayo VM7Luc ER TA (3) con la línea celular VM7Luc4E2¹ que expresa predominantemente hER α con cierta contribución de hER β (4) (5).

Para la elaboración y la validación de ensayos similares relativos al mismo parámetro de peligro, se dispone de normas de comportamiento (6) (7), que deben utilizarse.

¹ Hasta junio de 2016, esta línea celular se designaba BG1Luc. Las células BG-1 fueron descritas inicialmente por Geisinger *et al.* (1998) (35) y fueron caracterizadas más tarde por investigadores del National Institute of Environmental Health Sciences de EE. UU. (NIEHS) (36). Hace relativamente poco tiempo, se ha descubierto que existen dos variantes diferentes de las células BG-1 que utilizan los investigadores, la BG-1 Fr y la BG-1 NIEHS. Un análisis en profundidad, con ensayos de ADN, de las dos variantes de las líneas celulares BG-1 llevado a cabo por Li y colaboradores (2014) (37) puso de manifiesto que la BG-1 Fr era única y que la BG-1 NIEHS, es decir, la línea celular original utilizada para elaborar el ensayo, no era la línea celular BG1 de carcinoma de ovario humano, sino que era en cambio una variante de la línea celular MCF7 del cáncer de mama humano. La línea celular utilizada en el ensayo, anteriormente denominada BG1Luc4E2 (38), se designa ahora como VM7Luc4E2 (“V” = variante; “M7” = células MCF7). Asimismo, el ensayo se designa ahora como VM7Luc ER TA. Aunque esto cambia el origen de la línea celular en la que se basa el ensayo, no afecta a los estudios de validación publicados ni a la utilidad y aplicación de este ensayo para detectar productos con efectos estrogénicos/antiestrogénicos.

Permiten la oportuna modificación de las PBTG 455, para que puedan añadirse a unas PBTG actualizadas nuevos ensayos similares; sin embargo, esos ensayos similares solo se añadirán después de que la OCDE haya examinado si se cumplen las normas de comportamiento y haya manifestado que es así. Los ensayos incluidos en las TG 455 pueden utilizarse indistintamente para satisfacer los requisitos de los países miembros de la OCDE en cuanto a los resultados de los ensayos sobre la transactivación de receptores estrogénicos, y también se benefician de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en este método de ensayo

2. La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos. El marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de posibles alteradores endocrinos se revisó en 2012. Los marcos conceptuales originales y revisados se incluyen como anexos en el documento de orientación de la OCDE sobre las directrices de ensayo normalizadas para la evaluación de los productos en cuanto a las alteraciones endocrinas (8). El marco conceptual se compone de cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica. Los ensayos de transactivación de receptores estrogénicos (ER TA) descritos en este método de ensayo son de nivel 2, que incluye los ensayos *in vitro* que aportan datos sobre el mecanismo o mecanismos y rutas endocrinos seleccionados. Este método de ensayo se refiere a ensayos de transactivación (TA) *in vitro* diseñados para identificar a los agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (ER).
3. La interacción de los estrógenos con los ER puede afectar a la transcripción de genes controlados por estrógenos, lo cual puede dar lugar a la inducción o a la inhibición de procesos celulares, incluidos los necesarios para la proliferación celular, el desarrollo fetal normal y la función reproductora (9) (10) (11). La perturbación de los sistemas estrogénicos normales puede provocar efectos adversos sobre el desarrollo normal (ontogénesis), la salud reproductiva y la integridad del aparato reproductor.
4. Los ensayos TA *in vitro* se basan en una interacción directa o indirecta de las sustancias con un receptor específico que regula la transcripción de un producto del gen marcador. Estos ensayos se han utilizado ampliamente para evaluar la expresión génica regulada por receptores nucleares específicos como, por ejemplo, los ER (12) (13) (14) (15) (16), y se han propuesto para la detección de la transactivación estrogénica regulada por los ER (17) (18) (19). Hay por lo menos dos subtipos importantes de ER nucleares, los α y los β , que están codificados por distintos genes. Las respectivas proteínas tienen funciones biológicas diferentes, así como diferentes distribuciones tisulares y afinidades para unirse a ligandos (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). El ER α nuclear media la respuesta estrogénica clásica (27) (28) (29) (30), por lo que la mayoría de los modelos que se están elaborando actualmente para medir la activación o inhibición del ER son específicos de ER α . Los ensayos se utilizan para identificar los productos que activan (o inhiben) el ER tras la unión al

ligando, después de lo cual el complejo receptor-ligando se une a unos elementos específicos de respuesta de ADN y transactiva un gen marcador, lo que da lugar a mayor expresión celular de una proteína marcadora. En estos ensayos pueden utilizarse diferentes respuestas de marcadores. En los sistemas basados en la luciferasa, esta enzima transforma el sustrato de luciferina en un producto bioluminiscente que puede medirse cuantitativamente con un luminómetro. Otros ejemplos de marcadores comunes son el gen de la proteína fluorescente y el gen *LacZ*, que codifica la β -galactosidasa, enzima que puede transformar el sustrato incoloro X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-galactopiranosido) en un producto de color azul que puede cuantificarse con un espectrofotómetro. Estos marcadores pueden evaluarse de forma rápida y poco costosa con los equipos de pruebas disponibles en el comercio.

5. Los estudios de validación de los ensayos STTA y VM7Luc TA han demostrado su pertinencia y fiabilidad con respecto a su finalidad prevista (3) (4) (5) (30). Las normas de comportamiento de los ensayos ER TA basados en la luminiscencia que utilizan líneas celulares de cáncer de mama se incluyen en el informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM relativo al método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): ensayo *in vitro* para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3). Estas normas de comportamiento se han modificado para que sean aplicables tanto a los ensayos STTA como a los VM7Luc TA (2).
6. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

Ámbito de aplicación y limitaciones relativas a los ensayos TA

7. Estos ensayos se proponen para fines de cribado y establecimiento de prioridades, pero también pueden proporcionar información mecánica que pueda utilizarse con un enfoque de ponderación de los ensayos. Se refieren a la TA inducida por un producto que se une a los ER en un sistema *in vitro*. Así pues, los resultados no deben extrapolarse directamente a la compleja señalización y regulación del sistema endocrino intacto *in vivo*.
8. La TA mediada por los ER se considera uno de los mecanismos clave de la alteración endocrina (AE), aunque existen otros mecanismos a través de los cuales se puede producir esta, entre ellos: i) interacciones con otros receptores y sistemas enzimáticos dentro del sistema endocrino, ii) síntesis de hormonas, iii) activación y/o inactivación metabólica de hormonas, iv) distribución de hormonas a los tejidos diana, y v) eliminación de hormonas del organismo. Ninguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo aborda estos modos de acción.
9. El presente método de ensayo aborda la capacidad de los productos para activar (es decir, actuar como agonistas) y también suprimir (es decir, actuar como antagonistas) la transcripción dependiente de los ER. Algunos productos pueden, en

función del tipo de células, mostrar actividad tanto agonista como antagonista y se conocen como moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM). Los productos que son negativos en estos ensayos pueden evaluarse en un ensayo de unión a ER antes de llegar a la conclusión de que el producto no se une al receptor. Además, solo es probable que los ensayos informen sobre la actividad de la molécula madre teniendo en cuenta la limitada capacidad de metabolización de los sistemas celulares *in vitro*. Teniendo en cuenta que durante la validación únicamente se utilizaron sustancias solas, no se ha abordado la aplicabilidad a mezclas problema. Sin embargo, el método de ensayo es teóricamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una sustancia de componentes múltiples, UVCB o mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

10. A efectos de información, en el cuadro 1 se presentan los resultados de los ensayos de actividad agonista correspondientes a las 34 sustancias que se sometieron a ensayo con los dos métodos de ensayo de referencia plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 26 se clasifican como agonistas ER definitivos y 8 son negativas sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de unión a ER y de TA, y/o el ensayo uterotrónico (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). En el cuadro 2 se presentan los resultados de los ensayos de actividad antagonista correspondientes a las 15 sustancias que se sometieron a ensayo con los dos métodos de ensayo de referencia plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 4 se clasifican como antagonistas ER definitivos/supuestos y 10 son negativas sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de unión a ER y de TA (2) (3) (18) (31). En referencia a los datos resumidos en los cuadros 1 y 2, había un 100 % de concordancia entre los dos métodos de ensayo de referencia en la clasificación de todas las sustancias, excepto una (mifepristona), en cuanto al ensayo de la actividad antagonista, y cada sustancia se clasificó correctamente como agonista/antagonista ER o negativa. En las normas de comportamiento aplicables a la ER TA (6) (7), apéndice 2 (cuadros 1, 2 y 3) se ofrece información suplementaria sobre este grupo de productos, así como sobre otros productos objeto de los ensayos de tipo STTA y VM7Luc ER durante los estudios de validación.

Cuadro 1: Resumen de los resultados de los ensayos STTA y VM7Luc ER AT con sustancias objeto de los dos ensayos de la actividad agonista y clasificadas como agonistas ER (POS) o negativas (NEG).

	Sustancia	N.º CAS	Ensayo STTA ¹			Ensayo VM7Luc ER TA ²		Procedencia de los datos para la clasificación ⁴		
			Actividad ER TA	Valor CP ₁₀ (M)	Valor CP ₅₀ ^b (M)	Actividad ER TA	Valor CE ₅₀ ^{b,3} (M)	Otras ER TA ^c	Unión ER	Uterotrófico
1	17β-Estradiol ^a	50-28-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POS	$5,63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-Estradiol ^a	57-91-0	POS	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	POS	$1,40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-Etinil-estradiol ^a	57-63-6	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$< 1,00 \times 10^{-11}$	POS	$7,31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-Trembolona	10161-33-8	POS	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	POS	$4,20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NE	NE
5	19-Nortestosterona ^a	434-22-0	POS	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-Cumilfenol ^a	599-64-4	POS	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POS	$3,20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	NE
7	4- <i>terc</i> -Octilfenol ^a	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	POS	$3,19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenina ^a	520-36-5	POS	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	NE
9	Atrazina ^a	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NE
10	Bisfenol A ^a	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POS	$5,33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B ^a	77-40-7	POS	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POS	$1,95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Ftalato de butilbencilo ^a	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$1,98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG
13	Corticosterona ^a	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG (6/6)	NEG	NE
14	Cumestrol ^a	479-13-0	POS	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POS	$1,32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	NE
15	Daidzeína ^a	486-66-8	POS	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POS	$7,95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietilestilbestrol ^a	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POS	$3,34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	NE
17	Ftalato de di-n-butilo	84-74-2	POS	$4,09 \times 10^{-6}$		POS	$4,09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	(sin CP ₅₀)	POS	$2,48 \times 10^{-5}$	POS		NE
19	Estrona ^a	53-16-7	POS	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POS	$2,34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteína ^a	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POS	$2,71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NE
22	Canferol ^a	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NE
23	Kepone ^a	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NE
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NE

25	Linurón ^a	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NE
26	<i>meso</i> -Hexestrol ^a	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NE
27	Metil-testosterona ^a	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NE
28	Morina	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NE
29	Noretinodrel ^a	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NE
30	<i>p,p'</i> -Metoxicloro ^a	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(sin CP ₅₀) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital ^a	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NE
32	Reserpina	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NE
33	Espironolactona ^a	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NE
34	Testosterona	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NE

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; CE₅₀ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad del efecto máximo; NEG = negativo; POS = positivo; NE = No se ha ensayado; CP₁₀ (y CP₅₀) = concentración de una sustancia problema a la que la respuesta es del 10 % (o del 50 % en el caso de la CP₅₀) de la respuesta inducida por el testigo positivo (E2, 1 nM) en cada placa.

^a Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como agonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el estudio de validación VM7Luc ER TA (informe de evaluación VM7Luc ER TA del ICCVAM, cuadro 4-1) (3).

^b La concentración máxima sometida a ensayo en ausencia de limitaciones por citotoxicidad o insolubilidad fue de 1×10^{-5} M (ensayo STTA) y 1×10^{-3} M (ensayo VM7Luc ER TA).

^c Los números entre paréntesis representan los resultados de los ensayos clasificados como positivos (POS) o negativos (NEG) sobre el número total de estudios de referencia.

¹ Valores comunicados en el proyecto de informe de prevalidación y de validación interlaboratorios del ensayo de activación transcripcional (TA) transfectada establemente para detectar actividad estrogénica - ensayo de gen marcador mediado por el receptor estrogénico alfa humano utilizando la línea celular hER-HeLa-9903 (2).

² Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

³ Los valores medios de la CE₅₀ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

⁴ La clasificación como agonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los métodos de ensayo de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notas: Cada ensayo dentro del presente método de ensayo no cuenta con las mismas mediciones. En algunas situaciones, no puede calcularse la CE₅₀ porque no se genera una curva completa dosis-respuesta. Aunque con el ensayo STTA el valor de CP₁₀ es una medición clave, también puede haber otros ejemplos en los que un valor de CP_x proporcione información útil.

Cuadro 2: Resumen de los resultados de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA con sustancias objeto de los dos ensayos de la actividad antagonista y clasificadas como antagonistas ER (POS) o negativas (NEG).

	Sustancia ^a	N.º CAS	Ensayo ER STTA ¹		Ensayo VM7Luc ER TA ²		Efectos candidatos del ER STTA ⁴	Clasificación de consenso del ICCVAM ⁵	Clase química del MeSH ⁶	Clase de producto ⁷
			Actividad ER TA	Valor de CI ₅₀ ^b (M)	Actividad ER TA	Valor de CI ₅₀ ^{b,3} (M)				
1	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	POS moderado	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
2	Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	POS	Sin CI ₅₀	POS	Sin CI ₅₀	POS	SP	Compuestos policíclicos	Productos de laboratorio, productos naturales
3	Mifepristona	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	POS suave	NEG	Esteroides	Productos farmacéuticos
4	Raloxifeno HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	POS moderado	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
5	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	SN	SN	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
7	Apigenina	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Compuestos heterocíclicos	Colorantes, productos naturales, productos intermedios farmacéuticos
8	Atrazina	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	SN	Compuestos heterocíclicos	Herbicidas
9	Ftalato de di-n-butilo	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ésteres, ácido ftálico	Ingredientes de cosméticos, productos industriales, plastificantes
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	No se ha ensayado	SN	Compuestos heterocíclicos, pirimidina	Fungicidas
11	Flavona	525-82-6	NEG	-	NEG	-	SN	SN	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales, productos farmacéuticos
12	Flutamida	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	SN	Amidas	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
13	Genisteína	446-72-0	NEG	-	NEG	-	SN	NEG	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales, productos farmacéuticos

14	<i>p</i> -n-Nonilfenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	No se ha ensayado	NEG	Fenoles	Productos intermedios
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	SN	NEG	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos naturales

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; CI₅₀ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad de la inhibición máxima; NEG = negativo; SP = supuesto negativo; POS = positivo; SP = supuesto positivo.

^a Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como antagonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el informe de validación del VM7Luc ER TA (2) (3).

^b La concentración máxima sometida a ensayo en ausencia de limitaciones por citotoxicidad o insolubilidad fue de 1 x 10⁻³ M (ensayo STTA) y 1 x 10⁻⁵ M (ensayo VM7Luc ER TA).

¹ Informe de validación del ensayo de activación transcripcional transfectada establemente para detectar actividad mediada por ER, parte B (2).

² Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

³ Los valores medios de la CI₅₀ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

⁴ Actividad ER STTA asumida a partir de sus efectos notificados conocidos por los datos históricos del CERI sobre el ensayo de unión con el receptor ER, el ensayo uterotrófico y la información recopilada a partir de la bibliografía de acceso público (2).

⁵ La clasificación como antagonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los ensayos de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA

Componentes esenciales del ensayo

11. Este método de ensayo se aplica a los ensayos que utilizan un receptor ER α transfectado establemente o endógeno y una construcción de gen marcador transfectado establemente bajo el control de uno o más elementos de respuesta estrogénica; sin embargo, pueden estar presentes otros receptores, como el ER β . Estos son los componentes esenciales del ensayo.

Testigos

12. Debe describirse la base de los patrones de referencia en paralelo propuestos para cada ensayo de agonistas y de antagonistas. Los testigos en paralelo (negativos, de disolvente y positivos), según proceda, sirven para indicar que el ensayo funciona en las condiciones de ensayo y proporcionan la base para comparar unos experimentos con otros; generalmente forman parte de los criterios de aceptabilidad de un determinado experimento (1).

Procedimientos normales de control de calidad

13. Deben llevarse a cabo procedimientos normales de control de calidad, tal como se describe para cada ensayo, a fin de garantizar que la línea celular se mantiene estable a lo largo de varios pases, exenta de micoplasmas (es decir, libre de contaminación bacteriana), y conserva a lo largo del tiempo la capacidad de proporcionar las respuestas esperadas mediadas por ER. Las líneas celulares deben someterse a un control adicional para comprobar su identidad correcta, así como para detectar la eventual presencia de otros contaminantes (por ejemplo, hongos, levaduras y virus).

Demostración de la competencia del laboratorio

14. Antes de someter productos desconocidos a alguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo, cada laboratorio debe demostrar su competencia para utilizar el ensayo. Para demostrar tal competencia, cada laboratorio debe probar las catorce sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 3 en relación con el ensayo de agonistas y las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 4 en relación con el ensayo de antagonistas. Esta prueba de la competencia también confirmará la sensibilidad del sistema de ensayo. La lista de sustancias para la prueba de la competencia es un subconjunto de las sustancias de referencia que figuran en las normas de comportamiento relativas a los ensayos ER TA (6). Estas sustancias están disponibles en el mercado, representan las clases de productos normalmente asociadas con la actividad agonista o antagonista ER, presentan una gama adecuada de potencia esperada en cuanto a su actividad como agonistas/antagonistas ER (es decir, de fuerte a débil) e incluyen negativos. Los ensayos de las sustancias para la prueba de la competencia deben repetirse al menos dos veces, en diferentes días. La competencia se demuestra por la clasificación correcta (positiva/negativa) de cada sustancia para la prueba de la competencia. Cada técnico debe

repetir la prueba de la competencia al aprender los ensayos. En función del tipo de células, algunas de estas sustancias para la prueba de la competencia pueden comportarse como SERM y mostrar actividad como agonistas y como antagonistas. Sin embargo, las sustancias para la prueba de la competencia se clasifican en los cuadros 3 y 4 por su actividad predominante conocida, que es la que debe utilizarse para la evaluación de la competencia.

15. Para demostrar el comportamiento y con fines de control de la calidad, cada laboratorio debe compilar bases de datos históricos de agonistas y de antagonistas con datos sobre los patrones de referencia (por ejemplo, 17 β -estradiol y tamoxifeno), las sustancias testigo positivo y negativo y los controles del disolvente (por ejemplo, DMSO). En primer lugar, la base de datos debe generarse a partir de al menos diez tandas independientes con agonistas (por ejemplo, 17 β -estradiol) y diez tandas independientes con antagonistas (por ejemplo, tamoxifeno). Deben añadirse los resultados de futuros análisis de estos patrones de referencia y controles del disolvente para ampliar la base de datos a fin de garantizar la coherencia y el comportamiento del bioensayo realizado por el laboratorio a lo largo del tiempo.

Cuadro 3: Lista de catorce sustancias para la prueba de la competencia con el ensayo de agonistas⁸

N. ^{o7}	Sustancia	N.º CAS	Respuesta prevista ¹	Ensayo STTA			Ensayo VM7Luc ER TA		Clase química del sistema MeSH ⁵	Clase de producto ⁶
				Valor de CP ₁₀ (M) ²	Valor de CP ₅₀ (M) ²	Intervalo conc. ensayo (M)	Valor de CE ₅₀ en VM7Luc (M) ³	Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ⁴		
14	Dietilestilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
12	17 α -Estradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Hidrocarburos (cíclicos), fenoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
11	4-terc-Octilfenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenoles	Productos intermedios
9	Genisteína	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales, productos farmacéuticos
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenoles	Productos intermedios
2	Canferol	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales
3	Ftalato de butilbencilo	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Ácidos carboxílicos, ésteres, ácido ftálico	Plastificantes, productos industriales
4	p,p'-Metoxicloro	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Hidrocarburos (halogenados)	Plaguicidas, productos veterinarios
1	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Ácidos carboxílicos, ésteres	Productos farmacéuticos, conservantes
17	Atrazina	1912-24-9	NEG	-	-	$10^{-10} - 10^{-4}$	-	$4,64 \times 10^{-4}$	Compuestos heterocíclicos	Herbicidas
20	Espironolactona	52-01-7	NEG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$2,40 \times 10^{-3}$	Lactonas, esteroides	Productos farmacéuticos
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$9,41 \times 10^{-5}$	Compuestos heterocíclicos	Productos farmacéuticos
22	Reserpina	50-55-5	NEG	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$1,64 \times 10^{-3}$	Compuestos heterocíclicos, indoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; CE₅₀ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad del efecto máximo; NEG = negativo; POS = positivo;

CP₁₀ (y CP₅₀) = concentración de una sustancia problema a la que la respuesta es del 10 % (o del 50 % en el caso de la CP₅₀) de la respuesta inducida por el testigo positivo (E2, 1 nM) en cada placa.

- ¹ La clasificación como positivo o negativo respecto a la actividad de agonista ER se basó en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM sobre los ensayos de unión a los ER y TA (31), así como en datos empíricos y otra información obtenida de estudios de referencia publicados y revisados tras la finalización de dichos documentos del ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- ² Valores comunicados en el proyecto de informe de prevalidación y de validación interlaboratorios del ensayo de activación transcripcional (TA) transfectada establemente para detectar actividad estrogénica - ensayo de gen marcador mediado por el receptor estrogénico alfa humano utilizando la línea celular hER-HeLa-9903 (30).
- ³ Los valores medios de la CE₅₀ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).
- ⁴ Las concentraciones indicadas son las concentraciones más altas objeto de ensayo (determinación del intervalo) durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA. Si las concentraciones difieren entre los laboratorios, se comunica la concentración más elevada. Véase el cuadro 4-10 del Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA): ensayo in vitro para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3).
- ⁵ Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- ⁶ Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- ⁷ Del cuadro 1 [Lista de productos de referencia (22) para la evaluación de la exactitud de los agonistas ER] de las normas de comportamiento (6).
- ⁸ Si una sustancia para la prueba de la competencia deja de estar disponible en el comercio, puede utilizarse una sustancia con la misma clasificación y de potencia, modo de acción y clase química comparables.

Cuadro 4: Lista de diez sustancias para la prueba de la competencia con el ensayo de antagonistas

	Sustancia ^a	N.º CAS	Ensayo ER STTA ¹			Ensayo VM7Luc ER TA ²			Efectos candidatos del ER STTA ¹	Clasificación de consenso del ICCVAM ⁵	Clase química del MeSH ⁶	Clase de producto ⁷
			Actividad ER TA	CI ₅₀ (M)	Intervalo conc. ensayo (M)	Actividad ER TA	CI ₅₀ ³ (M)	Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ⁴				
1	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	POS moderado	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
2	Raloxifeno HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	POS moderado	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
3	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	Previsto que sea negativo*	SN	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
5	Apigenina	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Compuestos heterocíclicos	Colorantes, productos naturales, productos intermedios farmacéuticos
6	Ftalato de di-n-butilo	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ésteres, ácido ftálico	Ingredientes de cosméticos, productos industriales, plastificantes
7	Flavona	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	Previsto que sea negativo*	SN	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales, productos farmacéuticos
8	Genisteína	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	Previsto que sea negativo*	NEG	Flavonoides, compuestos heterocíclicos	Productos naturales, productos farmacéuticos
9	<i>p</i> -n-Nonilfenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	No se ha ensayado	NEG	Fenoles	Productos intermedios

10	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	Previsto que sea negativo*	NEG	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos naturales

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; CI_{50} = concentración de la sustancia problema que produce la mitad de la inhibición máxima; NEG = negativo; SP = supuesto negativo; POS = positivo;

* Clasificado como negativo según la revisión de la bibliografía (2).

^a Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como antagonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el informe de validación del VM7Luc ER TA (2) (3).

¹ Informe de validación del ensayo de activación transcripcional transfectada establemente para detectar actividad mediada por ER, parte B (2).

² Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

³ Los valores medios de la CI_{50} se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

⁴ Las concentraciones indicadas son las concentraciones más altas objeto de ensayo (determinación del intervalo) durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA. Si las concentraciones difieren entre los laboratorios, se comunica la concentración más elevada. Véase el cuadro 4-11 del Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA): ensayo *in vitro* para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3).

⁵ La clasificación como antagonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los métodos de ensayo de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Criterios de aceptabilidad de las tandas de ensayo

16. La aceptación o el rechazo de una tanda de ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con los patrones de referencia y los testigos utilizados para cada experimento. Los valores correspondientes a CP_{50} (CE_{50}) o CI_{50} de los patrones de referencia deben cumplir los criterios de aceptabilidad establecidos para el ensayo seleccionado (para el STTA véase el apéndice 2, para el VM7Luc TA véase el apéndice 3), y todos los testigos positivos o negativos deben clasificarse correctamente con cada experimento aceptado. La capacidad de realizar el ensayo de forma coherente debe demostrarse mediante la elaboración y el mantenimiento de una base de datos históricos sobre los patrones de referencia y los testigos (véase el punto 15). Las desviaciones típicas (DT) o los coeficientes de variación (CV) de las medias de los parámetros de ajuste de la curva de los patrones de referencia a partir de experimentos múltiples pueden utilizarse como medida de la reproducibilidad intralaboratorios. Además, deben cumplirse los siguientes principios en relación con los criterios de aceptabilidad:

- Los datos deben ser suficientes para una evaluación cuantitativa de la activación del ER (para el ensayo de agonistas) o de su supresión (para el ensayo de antagonistas) (es decir, eficacia y potencia).
- La actividad media del marcador correspondiente a la concentración de referencia del estrógeno de referencia debe ser, al menos, la mínima especificada en los ensayos en relación con la del control del vehículo (disolvente) para garantizar una sensibilidad adecuada. En los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, esto es cuatro veces el valor de la media del control del vehículo en cada placa.
- Las concentraciones ensayadas deben mantenerse dentro del intervalo de solubilidad de los productos problema y no mostrar citotoxicidad.

Análisis de los datos

17. Para clasificar una respuesta como positiva y negativa debe utilizarse el procedimiento definido de interpretación de datos correspondiente a cada ensayo.
18. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad (punto 16) indica que el ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La reproducción de los resultados de la primera tanda es la mejor indicación de que se han producido datos exactos. Si dos tandas dan resultados reproducibles (por ejemplo, si los resultados de ambas tandas de ensayo indican que es positivo un producto problema), no es necesario realizar una tercera tanda.
19. Si no se obtienen resultados reproducibles en dos tandas (por ejemplo, un producto problema es positivo en una sola tanda y negativo en la otra), o si es necesario un grado de certeza más elevado en relación con el resultado de este ensayo, deben realizarse al menos tres tandas

independientes. En este caso, la clasificación se basa en los dos resultados concordantes de los tres.

Criterios generales de interpretación de los datos

20. Actualmente no se dispone de un método aceptado universalmente para interpretar los datos del ensayo ER TA. Sin embargo, tanto las evaluaciones cualitativas (por ejemplo, positivo/negativo) como las cuantitativas (por ejemplo, CE₅₀, CP₅₀, CI₅₀) de la actividad mediada por ER deben basarse en datos empíricos y en un sólido juicio científico. Cuando sea posible, los resultados positivos deben caracterizarse tanto por la magnitud del efecto en comparación con el control del vehículo (disolvente) o el estrógeno de referencia como por la concentración a la que se produce el efecto (por ejemplo, CE₅₀, CP₅₀, RCP_{Máx}, CI₅₀, etc.).

Informe del ensayo

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

Ensayo:

- Ensayo utilizado;
- Testigo/ patrón de referencia / producto problema
- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;
- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

- caracterización (naturaleza, proveedor y lote);

- justificación de la elección del disolvente o vehículo;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

- tipo y origen de las células;
 - ¿Se expresa el ER de forma endógena? En caso contrario, ¿qué receptor o receptores se han transfectado?
 - Construcción o construcciones marcadoras utilizadas (incluyendo las especies origen);
 - Método de transfección;
 - Método de selección para mantener la transfección estable (cuando proceda);
 - ¿Es pertinente para las líneas estables el método de transfección?
- número de pases celulares (después de la descongelación);
- número del pase de las células en el momento de la descongelación;
- métodos de mantenimiento de los cultivos celulares.

Condiciones del ensayo:

- limitaciones de la solubilidad;
- descripción de los métodos de evaluación de la viabilidad aplicados;
- composición de los medios, concentración de CO₂;
- concentración del producto problema;
- volúmenes de vehículo y de producto problema añadidos;
- temperatura y humedad de la incubación;
- duración del tratamiento;
- densidad celular al principio del tratamiento y durante este;
- patrones de referencia positivos y negativos;
- reactivos del marcador (nombre del producto, proveedor y lote);
- criterios empleados para considerar que las tandas de ensayo son positivas, negativas o dudosas.

Comprobación de la aceptabilidad:

- factor de inducción para cada placa de ensayo y si cumple el mínimo requerido por el ensayo sobre la base de los controles históricos;
- valores reales para los criterios de aceptabilidad, por ejemplo valores de $\log_{10} CE_{50}$, $\log_{10} CP_{50}$, $\log CI_{50}$ y pendiente de Hill, correspondientes a los testigos positivos en paralelo y a los patrones de referencia.

Resultados:

- datos en bruto y normalizados;
- nivel máximo del factor de inducción;
- datos de citotoxicidad;
- si existe, concentración efectiva mínima (CE_{Min});
- $RCP_{Máx}$, $CP_{Máx}$, CP_{50} , CI_{50} y/o CE_{50} , según corresponda;
- relación concentración-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, en su caso, junto con una medida del error y de la confianza (por ejemplo, SEM, DT, CV o IC del 95 %) y una descripción de cómo se han obtenido dichos valores.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): p. 5367-73.
- (5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): p. 67-82.
- (6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

- (10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): p. 1073-89.
- (11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63- 6.
- (12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): p. 179-189.
- (13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): p. 173-187.
- (14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): p. 91- 98.
- (15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): p. 81-118.
- (16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): p. 1459-69.
- (17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): p. 379-383.
- (21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): p. 122-126.
- (22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): p. 4258-4265.

- (23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): p. 204-211.
- (24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol.*, 54(1): p. 105-12.
- (25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): p. 1703-1714.
- (26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): p. 558-568.
- (27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): p. 1460-1468.
- (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): p. 515-522.
- (29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: p. 45-80.
- (30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3):p. 547-569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).
- (32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- (34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.

- (36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

Apéndice 1

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Criterios de aceptabilidad: Normas mínimas para la realización de controles experimentales y patrones de referencia. Para que un experimento se considere válido deben cumplirse todos los criterios de aceptabilidad.

Exactitud (concordancia): Grado de coincidencia entre los resultados de un ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (1).

Agonista: Sustancia que produce una respuesta, por ejemplo transcripción, cuando se une a un receptor específico.

Antagonista: Tipo de producto o de ligando de un receptor que no provoca una respuesta biológica en sí como consecuencia de su unión a un receptor, sino que bloquea o amortigua las respuestas mediadas por los agonistas.

Actividad antiestrogénica: Capacidad de un producto de suprimir la acción del 17 β -estradiol mediada a través de receptores estrogénicos.

Morfología celular: Forma y aspecto de las células cultivadas en una monocapa en un solo pocillo de una placa de cultivo de tejidos. Las células que están muriendo suelen presentar una morfología celular anormal.

MC: Marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

Tratamiento de carbón/dextrano: Tratamiento del suero utilizado en el cultivo celular. El tratamiento con carbón/dextrano (a menudo denominado «separación») elimina las hormonas endógenas y las proteínas de unión de hormonas.

Producto: Sustancia o mezcla.

Citotoxicidad: Efectos nocivos para la estructura o la función celular que pueden finalmente causar la muerte de las células y puede reflejarse mediante una reducción del número de células presentes en el pocillo al final del período de exposición o mediante una reducción de la capacidad respecto a una medida de la función celular en comparación con el control en paralelo del vehículo.

CV: Coeficiente de variación.

DCC-FBS: Suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano.

DMEM: Modificación de Dulbecco del medio de Eagle.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

E2: 17 β -estradiol.

CE₅₀: Concentración del producto problema que produce la mitad del efecto máximo.

AE: Alteración endocrina.

hER α : Receptor estrogénico humano alfa.

hER β : Receptor estrogénico humano beta.

EFM: Medio libre de estrógenos. Modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM), complementado con 4,5 % de FBS tratado con carbón/dextrano, 1,9 % de L-glutamina y 0,9 % de Pen-Strep (penicilina-estreptomicina).

ER: Receptor estrogénico.

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos.

Actividad estrogénica: Capacidad de un producto para imitar al 17 β -estradiol en su posibilidad de unirse a los receptores estrogénicos y activarlos. La actividad estrogénica mediada por hER α puede detectarse con este método de ensayo.

ERTA: Transactivación de los receptores estrogénicos.

FBS: Suero bovino fetal.

HeLa: Línea celular de cuello de útero humana inmortal.

HeLa9903: Un subclón de la línea celular HeLa al que se han transfectado de forma estable un gen marcador de la luciferasa y hER α .

CI₅₀: Concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima.

ICCVAM: Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos de Estados Unidos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que distintos laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias, pueden producir resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (1).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes,

utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (1).

CE_{Mín}: Concentración efectiva mínima; es la concentración más baja del producto problema que produce una respuesta (es decir, la concentración más baja del producto problema en la que el factor de inducción es estadísticamente diferente al del control del vehículo en paralelo).

Ensayos de imitación: Expresión coloquial para denominar los ensayos que son estructural y funcionalmente similares a un método de ensayo de referencia validado y aceptado. También se pueden denominar métodos de ensayo similares.

MT: Metalotioneína.

MMTV: Virus de tumor mamario de ratón.

OHT: 4-Hidroxitamoxifeno.

PBTG: Directrices de ensayo basadas en el comportamiento.

TP (testigo positivo): Sustancia muy activa, de preferencia el 17 β -estradiol, que se incluye en todos los ensayos para contribuir a garantizar el buen funcionamiento de estos.

CP₁₀: Concentración de un producto problema a la que la actividad medida en un ensayo de agonistas es el 10 % de la actividad máxima inducida por el TP (E2 1 nM en el ensayo STTA) en cada placa.

CP₅₀: Concentración de un producto problema a la que la actividad medida en un ensayo de agonistas es el 50 % de la actividad máxima inducida por el TP (E2 a la concentración de referencia especificada en el método de ensayo) en cada placa.

CP_{Máx}: Concentración a la que un producto problema induce la RCP_{Máx}.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluye lo siguiente: 1) los componentes esenciales del ensayo; 2) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y 3) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (1).

Sustancias para la prueba de la competencia: Subconjunto de las sustancias de referencia incluidas en las normas de comportamiento que pueden ser utilizadas por los laboratorios para demostrar la competencia técnica con un método de ensayo normalizado. Los criterios de selección de estas sustancias suelen incluir que representen la gama de respuestas, que estén disponibles en el mercado y que se disponga sobre ellas de datos de referencia de alta calidad.

Competencia: Capacidad demostrada de realizar correctamente un ensayo antes de someter a

este sustancias desconocidas.

Estrógeno de referencia (testigo positivo, TC): 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Patrón de referencia: Sustancia de referencia utilizada para demostrar la adecuación de un ensayo. El 17 β -estradiol es el patrón de referencia de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA.

Métodos de ensayo de referencia: Ensayos sobre los que se basan las PBTG 455.

Pertinencia: Descripción de la relación de un ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (1).

Fiabilidad: Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios.

ULR: Unidades luminosas relativas.

ARN: Ácido ribonucleico.

RCP_{Máx}: Nivel máximo de respuesta inducido por un producto problema, expresado como porcentaje de la respuesta inducida por la solución 1 nM de E2 en la misma placa.

RPMI: Medio RPMI 1640 complementado con 0,9 % de Pen-Strep y 8,0 % de suero bovino fetal (FBS).

Tanda: Experimento individual que evalúa la acción del producto sobre los resultados biológicos del ensayo. Cada tanda es un experimento completo realizado en pocillos replicados de células cultivadas a partir de un conjunto común de células al mismo tiempo.

Tanda independiente: Experimento aparte e independiente que evalúa la acción del producto sobre los resultados biológicos del ensayo, utilizando células procedentes de un conjunto diferente y productos recién diluidos, realizada en días distintos o el mismo día por personal diferente.

DT: Desviación típica.

Sensibilidad: Proporción de todas las sustancias activas/positivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (1).

Especificidad: Proporción de todas las sustancias inactivas/negativas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (1).

Transfección estable: Cuando se transfecta ADN a células cultivadas de tal manera que se integra de forma estable en el genoma de las células, dando lugar a la expresión estable de genes transfectados. Los clones de células transfectadas de forma estable se seleccionan mediante marcadores estables (por ejemplo, resistencia al antibiótico G418).

Ensayo STTA: Ensayo de transactivación transfectada establemente, que es el ensayo de activación transcripcional ER α en el que se utiliza la línea celular HeLa 9903.

Estudio: Todo el conjunto de trabajo experimental realizado para evaluar una única sustancia específica mediante un ensayo específico. El estudio comprende todas las fases, incluidos los ensayos de dilución de la sustancia problema en los medios de ensayo, las tandas de determinación preliminar del intervalo, todas las tandas completas necesarias, los análisis de datos, la garantía de calidad, las evaluaciones de la citotoxicidad, etc. La realización de un estudio permite clasificar la actividad del producto problema en relación con la diana de toxicidad (es decir, activo, inactivo o no concluyente) que se evalúa mediante el ensayo utilizado y una estimación de la potencia relativa al producto de referencia positivo.

Sustancia: Según REACH¹², una sustancia se define como un elemento químico y sus compuestos naturales o los obtenidos mediante algún proceso industrial, incluidos los aditivos necesarios para conservar su estabilidad y las impurezas que inevitablemente se produzcan en el proceso, con exclusión de todos los disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición. En el contexto del SGA de las Naciones Unidas se utiliza una definición muy similar (1).

TA (transactivación): Inicio de la síntesis de ARNm en respuesta a una señal química específica, como la fijación de un estrógeno al receptor estrogénico.

Ensayo: En el contexto de este método de ensayo, un ensayo es uno de los métodos aceptados como válido por cumplir los criterios de comportamiento establecidos. Los componentes del ensayo incluyen, por ejemplo, la línea celular específica con las condiciones de crecimiento asociadas, los medios específicos en los que se realiza el ensayo, las condiciones de configuración de las placas, la disposición y las diluciones de los productos problema, junto con cualquier otra medida requerida de control de la calidad y las correspondientes fases de evaluación de los datos.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

¹² Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. (DO L 304 de 22.11.2007, p. 1).

Transcripción: Síntesis de ARNm.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

Método de ensayo validado: Ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (1).

Validación: Proceso por el que se establece para un fin determinado la fiabilidad y pertinencia de un enfoque, método, ensayo, proceso o evaluación concretos (1).

CVe (control del vehículo): El disolvente que se utiliza para disolver el producto problema y las sustancias testigo se somete a ensayo únicamente como vehículo, sin producto disuelto.

VM7: Células de adenocarcinoma inmortalizado que expresan de forma endógena el receptor estrogénico.

VM7Luc4E2: La línea celular VM7Luc4E2 se ha obtenido de células de adenocarcinoma inmortalizado de origen humano VM7 que expresan de forma endógena ambas formas del receptor estrogénico (ER α y ER β) y se han transfectado establemente con el plásmido pGudLuc7.ERE. Este plásmido contiene cuatro copias de un oligonucleótido sintético que incluye el elemento de respuesta a estrógenos en dirección 5' respecto al promotor vírico del tumor de mama del ratón (MMTV) y el gen de la luciferasa de la luciérnaga.

Testigo positivo débil: Sustancia débilmente activa, seleccionada de la lista de productos de referencia y que se incluye en todos los ensayos para contribuir a garantizar el buen funcionamiento de estos.

Apéndice 2

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO A HUMANO TRANSFECTADO ESTABLEMENTE PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA Y ANTAGONISTA DE LOS PRODUCTOS, UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR HERA-HELA-9903

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de transactivación (TA) utiliza la línea celular hER α -HeLa-9903 para detectar la actividad de agonistas estrogénicos mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hER α). El estudio de validación del ensayo de transactivación transfectada establemente (STTA), realizado por el Instituto Japonés de Evaluación e Investigación de Productos Químicos (CERI) utilizando la línea celular hER α -HeLa-9903 para detectar la actividad estrogénica agonista y antagonista mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hER α), demostró la pertinencia y fiabilidad del ensayo para su fin previsto (1).
2. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la TA mediada a través del hER α midiendo la quimioluminiscencia como parámetro. Sin embargo, se han comunicado señales de luminiscencia no mediadas por el receptor a concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μ M como consecuencia de la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa (2) (3). Si bien la curva dosis-respuesta indica que la activación real del sistema ER se produce a concentraciones más bajas, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos similares sospechosos de producir una sobreactivación de tipo fitoestrogénico del gen marcador de la luciferasa, en los sistemas de ensayo ER TA transfectados de forma estable (apéndice 1).
3. Las secciones “INTRODUCCIÓN GENERAL” y “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 2.1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

4. El ensayo se utiliza para detectar la unión del receptor estrogénico con un ligando. Tras la unión del ligando, el complejo receptor-ligando se traslada al núcleo, donde se une a determinados elementos específicos de respuesta del ADN y transactiva un gen marcador de la luciferasa de la luciérnaga, lo que provoca un aumento de la expresión celular de la enzima luciferasa. La luciferina constituye un sustrato que es transformado por la enzima luciferasa en un producto de bioluminiscencia que puede medirse cuantitativamente con un luminómetro. La actividad de la luciferasa puede evaluarse de forma rápida y poco costosa con varios equipos de pruebas disponibles en el comercio.

5. El sistema de ensayo utiliza la línea celular de hER α -HeLa-9903, procedente de un tumor de cuello de útero humano, con dos construcciones introducidas de forma estable: i) la construcción de expresión de hER α (que codifica el receptor humano completo), y ii) la construcción del marcador de la luciferasa de la luciérnaga, que lleva cinco repeticiones en tándem de un elemento sensible a los estrógenos (ERE, *Estrogen-Responsive Element*) de vitelogenina movilizado por un elemento TATA del promotor de metalotioneína (MT) del ratón. Se ha demostrado que la construcción génica MT TATA del ratón tiene el mejor comportamiento, por lo que se utiliza normalmente. Por consiguiente, esta línea celular hER α -HeLa-9903 puede medir la capacidad de un producto problema para inducir la transactivación mediada por hER α de la expresión del gen de la luciferasa.
6. En el caso de un ensayo de agonistas ER, la interpretación de los datos se basa en si el nivel máximo de respuesta inducida por un producto problema es igual o mayor al de una respuesta de agonistas igual al 10 % de la inducida por una concentración inductora máxima (1 nM) del testigo positivo (TP) 17 β -estradiol (E2) (es decir, la CP₁₀). En el caso de un ensayo de antagonistas ER, la interpretación de los datos se basa en si la respuesta muestra al menos una reducción del 30 % de la actividad respecto a la respuesta inducida por el control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) sin citotoxicidad. El análisis y la interpretación de los datos se detallan en los puntos 34 a 48.

PROCEDIMIENTO

Líneas celulares

7. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular hER α -HeLa-9903, transfectada de forma estable. La línea celular puede obtenerse del banco de células de la Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)¹³, previa firma de un acuerdo de transferencia de material (ATM).
8. En los ensayos solo deben utilizarse células caracterizadas como libres de micoplasmas. La RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) es el método preferido para la detección sensible de la infección por micoplasmas (4) (5) (6).

Estabilidad de la línea celular

9. Para supervisar la estabilidad de la línea celular, deben utilizarse el E2, el 17 α -estradiol, la 17 α -metiltestosterona y la corticosterona como patrones de referencia para el ensayo de

¹³ Banco de células del JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japón. Fax: +81-72-641-9812.

agonistas, y debe obtenerse una curva completa concentración-respuesta en el intervalo de concentraciones de ensayo que figura en el cuadro 1 al menos cada vez que se realice el ensayo, y los resultados deben estar de acuerdo con los resultados proporcionados en el cuadro 1.

10. En el caso de un ensayo de antagonistas, deben medirse simultáneamente con cada tanda curvas completas de concentración correspondientes a dos patrones de referencia, tamoxifeno y flutamida. Debe supervisarse la clasificación cualitativa correcta de los dos productos como positivos o negativos.

Condiciones de cultivo y siembra de las células

11. Las células deben mantenerse en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) sin rojo de fenol, complementado con 60 mg/l del antibiótico kanamicina y un 10 % de suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano (DCC-FBS), en una incubadora con CO₂ (5 % de CO₂) a 37 ± 1 °C. Tras alcanzar una confluencia del 75 -90 %, se hace un subcultivo de las células con 10 ml de 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ células/ml por placa de cultivo celular de 100 mm. Las células deben suspenderse con un 10 % de FBS-EMEM (que es lo mismo que EMEM con DCCB-FBS) y, a continuación, deben depositarse en pocillos de una microplaca en la proporción de 1 x 10⁴ células (100 µl/pocillo). A continuación, las células deben preincubarse en una incubadora con 5 % de CO₂ a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 3 horas antes de la exposición al producto. El material de plástico debe estar libre de actividad estrogénica.
12. Para mantener la integridad de la respuesta, las células deben cultivarse durante más de un pase después del cultivo madre congelado en los medios acondicionados y no deben cultivarse durante más de cuarenta pases. En el caso de la línea celular hER α -HeLa-9903, esto significa menos de tres meses. Sin embargo, las características de las células pueden hacerse menos favorables si se cultivan en condiciones inadecuadas.
13. El DCCB-FBS puede prepararse tal y como se describe en el apéndice 2.2 u obtenerse de fuentes comerciales.

Criterios de aceptabilidad

Patrones de referencia positivos y negativos para el ensayo de agonistas ER

14. Antes del estudio y durante el mismo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo utilizando las concentraciones adecuadas de un estrógeno fuerte (E2), un estrógeno débil (17 α -estradiol), un agonista muy débil (17 α -metiltestosterona), y una sustancia negativa (corticosterona). En el cuadro 1 figuran los valores del intervalo aceptable derivados del estudio de validación (1). Estos cuatro patrones de referencia en paralelo deben incluirse en cada experimento y los resultados deben quedar dentro de los límites aceptables establecidos. En caso contrario, debe determinarse la causa del incumplimiento de los criterios de aceptabilidad (por ejemplo, manipulación de las células, o calidad y concentración de suero y

antibióticos) y repetirse el ensayo. Una vez cumplidos los criterios de aceptabilidad, para garantizar una variabilidad mínima de los valores de CE_{50} , CP_{50} y CP_{10} , es esencial la utilización uniforme de los materiales para el cultivo celular. Los cuatro patrones de referencia en paralelo, que deben incluirse en cada experimento (realizado en las mismas condiciones, incluidos los materiales, el nivel de pases de las células y el personal técnico), pueden garantizar la sensibilidad del ensayo, ya que los valores de CP_{10} de los tres patrones de referencia positivos deben quedar dentro del intervalo aceptable, como también los valores de CP_{50} y de CE_{50} , cuando puedan calcularse (véase el cuadro 1).

Cuadro 1: Intervalo aceptable de valores de los cuatro patrones de referencia para el ensayo de agonistas ER.

Nombre	$\log CP_{50}$	$\log CP_{10}$	$\log CE_{50}$	Pendiente de Hill	Intervalo de ensayo
17 β -Estradiol (E2) N.º CAS: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	$10^{-14} \sim 10^{-8}$ M
17 α -Estradiol N.º CAS: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	$10^{-12} \sim 10^{-6}$ M
Corticosterona N.º CAS: 50-22-6	—	—	—	—	$10^{-10} \sim 10^{-4}$ M
17 α -Metiltestosterona N.º CAS: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	—	—	$10^{-11} \sim 10^{-5}$ M

Patrones de referencia positivos y negativos para el ensayo de antagonistas del ER

15. Antes del estudio y durante el mismo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo utilizando las concentraciones adecuadas de una sustancia positiva (tamoxifeno) y una sustancia negativa (flutamida). En el cuadro 2 figuran los valores del intervalo aceptable derivados del estudio de validación (1). Estos dos patrones de referencia en paralelo deben incluirse en cada experimento y los resultados deben considerarse correctos según se indica en los criterios. En caso contrario, debe determinarse la causa del incumplimiento de los criterios (por ejemplo, manipulación de las células, o calidad y concentración de suero y antibióticos) y repetirse el ensayo. Además, deben calcularse los valores de CI_{50} de una sustancia positiva (tamoxifeno) y los resultados deben quedar dentro de los límites aceptables establecidos. Una vez cumplidos los criterios de aceptabilidad, para garantizar una variabilidad mínima de los valores de CI_{50} , es esencial la utilización uniforme de los materiales para el cultivo celular. Los dos patrones de referencia en paralelo, que deben incluirse en cada experimento (realizado en las mismas condiciones, incluidos los materiales, el nivel de pases de las células y el personal técnico), pueden garantizar la sensibilidad del ensayo (véase el cuadro 2).

Cuadro 2: Criterios e intervalo aceptable de valores de los dos patrones de referencia para el ensayo de antagonistas del ER.

Nombre	Criterios	$\log CI_{50}$	Intervalo de ensayo

Tamoxifeno N.º CAS: 10540-29-1	Positivo: debe calcularse la CI ₅₀ .	-5,942 ~ -7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M
Flutamida N.º CAS: 13311-84-7	Negativo: no debe calcularse la CI ₃₀ .	-	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Testigos positivos y control del vehículo

16. El testigo positivo (TP) del ensayo de agonistas ER (1 nM de E2) y del ensayo de antagonistas ER (10 µM de tamoxifeno) se someterá a ensayo al menos por triplicado en cada placa. El vehículo que se utilice para disolver un producto problema debe someterse a ensayo como control del vehículo (CVe) al menos por triplicado en cada placa. Además de este CVe, si el TP utiliza un vehículo diferente al del producto problema, debe ensayarse otro CVe al menos por triplicado en la misma placa con el TP.

Criterios de calidad para el ensayo de agonistas ER

17. La actividad media de la luciferasa del testigo positivo (E2 1 nM) debe ser al menos cuatro veces la media del CVe de cada placa. Este criterio se establece sobre la base de la fiabilidad de los valores de los parámetros obtenidos en el estudio de validación (históricamente, un factor multiplicador de entre cuatro y treinta).
18. Con respecto al control de calidad del ensayo, el factor multiplicador de la inducción correspondiente al valor de CP₁₀ del TP en paralelo (E2 1 nM) debe ser superior a 1 + 2 DT del valor del factor multiplicador de la inducción (= 1) del CVe en paralelo. A efectos de priorización, el valor de CP₁₀ puede ser útil para simplificar el análisis de datos requerido en comparación con un análisis estadístico. Aunque un análisis estadístico proporciona información sobre la significación, dicho análisis no es un parámetro cuantitativo en relación con el potencial basado en la concentración, por lo que es menos útil a efectos de priorización.

Criterios de calidad para el ensayo de agonistas del ER

19. La actividad media de la luciferasa del control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) debe ser al menos cuatro veces la media del CVe de cada placa. Este criterio se establece sobre la base de la fiabilidad de los valores de los parámetros obtenidos en el estudio de validación.
20. Por lo que respecta al control de calidad del ensayo, la actividad transcripcional relativa (ATR) de la solución 1 nM de E2 debe ser superior al 100 %; la ATR de la solución 1 µM de 4-hidroxitamixofeno (OHT) debe ser inferior al 40,6 %, y la ATR de solución 100 µM de digitonina (Dig) debe ser inferior al 0 %.

Demostración de la competencia del laboratorio (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” del presente método de ensayo)

Vehículo

21. Debe utilizarse como CVe en paralelo el dimetilsulfóxido (DMSO), o el disolvente adecuado, a la misma concentración utilizada con los diferentes testigos positivos y negativos y los productos problema. Los productos problema deben disolverse en un disolvente que los solubilice y sea miscible con el medio celular. Son vehículos adecuados el agua, el etanol (pureza del 95 % al 100 %) y el DMSO. Si se utiliza el DMSO, el nivel no debe superar el 0,1 % (v/v). Con cualquier vehículo, debe demostrarse que el volumen máximo utilizado no es citotóxico ni interfiere con el comportamiento del ensayo.

Preparación de los productos problema

22. En general, los productos problema deben disolverse en DMSO o en otro disolvente adecuado, y diluirse en serie con el mismo disolvente a una proporción común de 1 : 10, a fin de preparar soluciones para la dilución con los medios.

Solubilidad y citotoxicidad: Consideraciones para la determinación del intervalo de dosis

23. Debe realizarse un ensayo preliminar para determinar el intervalo de concentraciones apropiadas del producto problema, y determinar si el producto problema puede tener dificultades en cuanto a su solubilidad y citotoxicidad. Inicialmente, los productos se someten a ensayo hasta la concentración máxima que suponga el valor más bajo de los siguientes: 1 µl/ml, 1 mg/ml, o 1 mM. Sobre la base del grado de citotoxicidad o falta de solubilidad observados en el ensayo preliminar, en la primera tanda definitiva debe someterse a ensayo el producto en diluciones logarítmicas empezando en la concentración máxima aceptable (p. ej., 1 mM, 100 µM, 10 µM, etc.) y debe anotarse la presencia de turbidez o precipitado o de citotoxicidad. Las concentraciones en la segunda y, si es necesaria, tercera tanda deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta y evitar concentraciones que resulten que son insolubles o inducen una citotoxicidad excesiva.
24. En el caso de los agonistas y antagonistas ER, la presencia de niveles crecientes de citotoxicidad puede alterar significativamente o eliminar la respuesta sigmoidea típica y debe tenerse en cuenta al interpretar los datos. Se utilizarán métodos de ensayo de citotoxicidad que puedan proporcionar información sobre una viabilidad celular del 80 %, utilizando un ensayo adecuado basado en la experiencia de laboratorio.
25. En caso de que los resultados del ensayo de citotoxicidad muestren que la concentración del producto problema ha reducido el número de células en un 20 % o más, esta concentración debe considerarse citotóxica, y las concentraciones iguales o superiores a la concentración citotóxica deben excluirse de la evaluación.

Exposición al producto y organización de la placa del ensayo

26. El procedimiento correspondiente a las diluciones del producto (fases 1 y 2) y a la exposición de las células (fase 3) se puede llevar a cabo del siguiente modo:

Fase 1: Cada producto problema debe diluirse en serie en DMSO, o en otro disolvente adecuado, y añadirse a los pocillos de una placa de microvaloración a fin de alcanzar las concentraciones seriadas finales determinadas por el ensayo preliminar de determinación del intervalo de concentraciones [normalmente en una serie de, por ejemplo, 1 mM , 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)] para ensayos por triplicado.

Fase 2: Dilución del producto: diluir en primer lugar 1,5 μ l del producto problema en el disolvente en un volumen de 500 μ l de medio.

Fase 3: Exposición de las células al producto: añadir 50 μ l de dilución en el medio (preparada en la fase 2) a un pocillo de ensayo que contenga 10^4 células/100 μ l/pocillo.

El volumen final recomendado de medio necesario para cada pocillo es de 150 μ l. Pueden asignarse las muestras de ensayo y los patrones de referencia como se muestra en el cuadro 3 y en el cuadro 4.

Cuadro 3: Ejemplo de asignación de las concentraciones de los patrones de referencia en la placa de ensayo en el ensayo de agonistas ER

Fila	17 α -Metiltestosterona			Corticosterona			17 α -Estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	Conc 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	CVe	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM).

27. Los patrones de referencia (E2, 17 α -estradiol, Los patrones de referencia (E2, 17 α -estradiol, 17 α -metil-testosterona y corticosterona) deben someterse a ensayo en cada tanda (cuadro 3). En cada placa del ensayo (cuadro 4) se deben incluir pocillos de TP tratados con solución 1 nM de E2 que puedan dar como resultado la máxima inducción de E2 y pocillos de CVe tratados únicamente con DMSO (o disolvente apropiado). Si en el mismo experimento se utilizan células procedentes de distintas fuentes (por ejemplo, con diferente número de pases, de un lote diferente, etc.), los patrones de referencia deben someterse a ensayo respecto a cada fuente de las células.

Cuadro 4: Ejemplo de asignación de las concentraciones de los productos problema y de los testigos de las placas en la placa de ensayo de agonistas ER

Fila	Producto problema 1			Producto problema 2			Producto problema 3			Producto problema 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→

B	Conc 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	CVe	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM).

Cuadro 5: Ejemplo de asignación de las concentraciones de los patrones de referencia en la placa de ensayo en el ensayo de antagonistas ER

Fila	Tamoxifeno			Flutamida			Producto problema 1			Producto problema 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	Conc 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	Conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	DMSO al 0,1 %	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	CVe	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

 = con adición de 25 pM de E2

28. Para evaluar la actividad antagonista de los productos, a los pocillos de ensayo situados en las filas de A a G se les debe añadir solución 25 pM de E2. Los patrones de referencia (tamoxifeno y flutamida) deben someterse a ensayo en cada tanda. En cada placa del ensayo deben incluirse pocillos de TP tratados con solución 1 nM de E2 que pueden servir de control de la calidad de la línea celular hER α -HeLa-9903, pocillos de CVe tratados con DMSO (o disolvente apropiado), pocillos con solución al 0,1 % de DMSO tratados con DMSO además del E2 añadido correspondiente al “control con el testigo añadido”, pocillos tratados con la concentración final de 1 μ M de OHT y pocillos tratados con 100 μ M Dig (cuadro 5). La placa del ensayo posterior debe seguir la misma disposición de placa sin los pocillos de los patrones de referencia (cuadro 6). Si en el mismo experimento se utilizan células procedentes de distintas fuentes (por ejemplo, con diferente número de pases, de un lote diferente, etc.), los patrones de referencia deben someterse a ensayo respecto a cada fuente de las células.

Cuadro 6: Ejemplo de asignación de las concentraciones de los productos problema y de los testigos de las placas del ensayo de antagonistas ER

Fila	Producto problema 1			Producto problema 2			Producto problema 3			Producto problema 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

A	Conc 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	Conc 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	Conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	DMSO al 0,1 %	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	CVe	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM), OHT: 4 -hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

 : con adición de solución
25 pM de E2

29. Debe confirmarse la ausencia de efectos de borde, según proceda, y, si se sospecha que hay presencia de estos efectos, debe modificarse la disposición de la placa para evitarlos. Por ejemplo, se puede utilizar una disposición de placa en la que se excluyan los pocillos del borde.
30. Después de añadir los productos, las placas de ensayo deben incubarse en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 ± 1 °C durante 20-24 horas para inducir la formación de los productos del gen marcador.
31. Deben aplicarse consideraciones especiales a los compuestos que sean ligeramente volátiles. En tales casos, los pocillos testigo cercanos pueden generar falsos positivos, lo que debe tenerse en cuenta a la luz de los valores previstos e históricos de los testigos. En los pocos casos en los que la volatilidad puede ser preocupante, el uso de “selladores de placas” puede ayudar a aislar eficazmente los distintos pocillos durante el ensayo, por lo que se recomienda en tales casos.
32. La repetición de los ensayos definitivos con el mismo producto debe hacerse en días distintos a fin de garantizar su independencia.

Ensayo de la luciferasa

33. Para el ensayo puede utilizarse un reactivo comercial del ensayo de la luciferasa [p. ej., el sistema de ensayo de la luciferasa Steady-Glo® (Promega, E2510, o equivalente)] o un sistema de ensayo de la luciferasa normal (p. ej., Promega, E1500, o equivalente), siempre que se cumplan los criterios de aceptabilidad. Los reactivos del ensayo deben seleccionarse sobre la base de la sensibilidad del luminómetro que se vaya a usar. Cuando se utilice el sistema de ensayo de la luciferasa normal, antes de añadir el sustrato se debe utilizar el reactivo de lisis del cultivo celular (p. ej., Promega, E1531, o equivalente). El reactivo de la luciferasa debe aplicarse siguiendo las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Ensayo de agonistas ER

34. En el caso de un ensayo de agonistas ER, para obtener la actividad transcripcional relativa respecto al TP (solución 1 nM de E2), las señales de luminiscencia de la misma placa pueden analizarse con arreglo a las siguientes fases (también son aceptables otros procesos matemáticos equivalentes):

Fase 1. Calcular el valor medio del C_{Ve}.

Fase 2. Restar el valor medio del C_{Ve} del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3. Calcular la media del TP normalizado.

Fase 4. Dividir el valor normalizado de cada pocillo en la placa por el valor medio del TP normalizado (TP = 100 %).

El valor final de cada pocillo es la actividad transcripcional relativa de ese pocillo en comparación con la respuesta del TP.

Fase 5. Calcular el valor medio de la actividad transcripcional relativa de cada grupo de concentraciones del producto problema. La respuesta tiene dos dimensiones: la media de la actividad transcripcional (respuesta) y la concentración a la que se produce la respuesta (véase la sección siguiente).

Consideraciones de la inducción respecto a CE₅₀, CP₅₀ y CP₁₀

35. La curva completa concentración-respuesta es necesaria para el cálculo de la CE₅₀, pero puede que esto no sea siempre factible o práctico debido a las limitaciones del intervalo de concentraciones de ensayo (a causa de, por ejemplo, problemas de solubilidad o de citotoxicidad). Sin embargo, dado que la CE₅₀ y el nivel de inducción máximo (que corresponde al valor superior de la ecuación de Hill) son parámetros informativos, estos parámetros deben comunicarse cuando sea posible. Para el cálculo de la CE₅₀ y del nivel de inducción máximo, deben utilizarse los programas estadísticos adecuados (p. ej., los programas informáticos estadísticos Prism). Si la ecuación logística de Hill es aplicable a los datos de respuesta a la concentración, la CE₅₀ debe calcularse con la ecuación siguiente (7):

$$Y = \text{valor inferior} + (\text{valor superior} - \text{valor inferior}) / (1 + 10^{\exp((\log CE_{50} - X) \times \text{pendiente de Hill})})$$
, donde:

X es el logaritmo de la concentración; e

Y es la respuesta; Y se inicia en el valor inferior y llega al valor superior siguiendo una curva sigmoidea. El valor inferior se fija en cero en la ecuación logística de Hill.

36. Respecto a cada producto problema debe proporcionarse la siguiente información:

la RCP_{Máx}, que es el nivel máximo de respuesta inducido por un producto problema, expresado

como porcentaje de la respuesta inducida por una solución 1 nM de E2 en la misma placa, así como la $CP_{Máx}$ (concentración asociada a la $RCP_{Máx}$); y

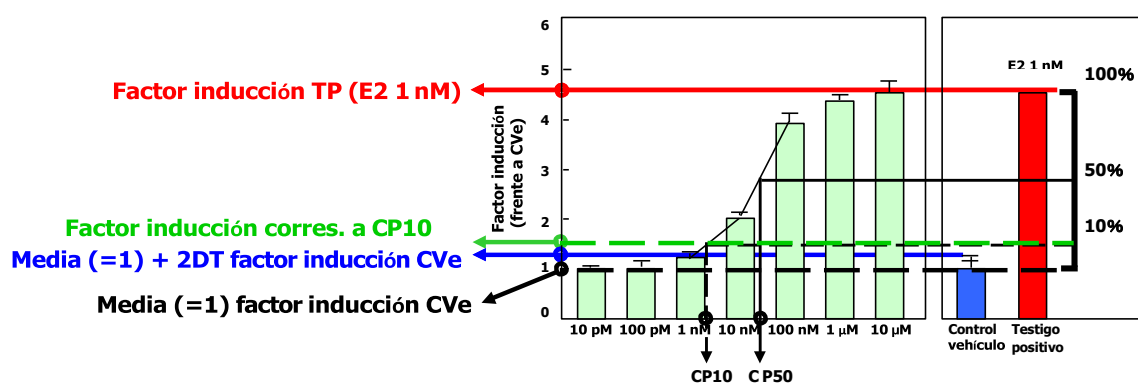
en el caso de productos positivos, las concentraciones que inducen la CP_{10} y, si procede, la CP_{50} .

37. El valor de la CP_x puede calcularse interpolando entre dos puntos en las coordenadas X-Y, uno inmediatamente por encima y otro inmediatamente por debajo de un valor de CP_x . Si los puntos de datos situados inmediatamente por encima y por debajo del valor de CP_x tienen las coordenadas (a, b) y (c, d) respectivamente, entonces el valor de CP_x podrá calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$\log [CP_x] = \log [c] + (x-d)/(d-b)$$

38. En la figura 1 se ofrecen descripciones de los valores de CP.

Figura 1: Ejemplo de cómo calcular los valores de CP. El TP (solución 1 nM de E2) se incluye en cada placa de ensayo.



Ensayo de antagonistas ER

39. En el caso de un ensayo de antagonistas ER, para obtener la actividad transcripcional relativa (ATR) respecto al control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2), las señales de luminiscencia de la misma placa pueden analizarse con arreglo a las siguientes fases (también son aceptables otros procesos matemáticos equivalentes):

Fase 1. Calcular el valor medio del C_{Ve}.

Fase 2. Restar el valor medio del C_{Ve} del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3. Calcular la media del control con el testigo añadido normalizado.

Fase 4. Dividir el valor normalizado de cada pocillo en la placa por el valor medio del "control con el testigo añadido" normalizado (control con el testigo añadido = 100 %).

El valor final de cada pocillo es la actividad transcripcional relativa de ese pocillo en comparación con la respuesta del control con el testigo añadido.

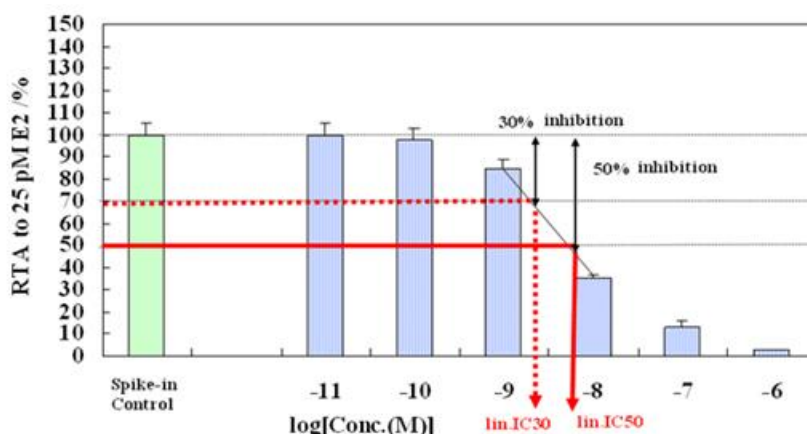
Fase 5. Calcular el valor medio de la actividad transcripcional relativa de cada tratamiento.

Consideraciones de la inducción respecto a CI₃₀ y CI₅₀

40. En el caso de los productos positivos, deben indicarse las concentraciones que inducen la CI₃₀ y, si procede, la CI₅₀.
41. El valor de CI_x puede calcularse interpolando entre dos puntos en las coordenadas X-Y, uno inmediatamente por encima y otro inmediatamente por debajo de un valor CI_x. Si los puntos de datos situados inmediatamente por encima y por debajo del valor de CI_x tienen las coordenadas (c, d) y (a, b) respectivamente, entonces el valor de CI_x podrá calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$\ln CI_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Figura 2: Ejemplo de cómo calcular los valores de CI. El control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) se incluye en cada placa de ensayo.



ATR: actividad transcripcional relativa.

42. Los resultados deben basarse en dos (o tres) tandas independientes. Si dos tandas dan resultados comparables y, por lo tanto, reproducibles, no es necesario realizar una tercera tanda. Para ser aceptables, los resultados deben:

- cumplir los criterios de aceptabilidad (véanse los criterios de aceptabilidad, puntos 14-20),
- ser reproducibles.

Criterios de interpretación de los datos

Cuadro 7: Criterios de decisión sobre el carácter positivo o negativo en el ensayo de agonistas ER.

Positivo	Si se obtiene una $RCP_{Máx}$ que es igual o superior al 10 % de la respuesta del testigo positivo en al menos dos de dos o dos de tres tandas.
Negativo	Si se obtiene una $RCP_{Máx}$ que es inferior al 10 % de la respuesta del testigo positivo en dos de dos o dos de tres tandas.

Cuadro 8: Criterios de decisión sobre el carácter positivo o negativo en el ensayo de antagonistas ER.

Positivo	Si se calcula la CI_{30} en al menos dos de dos o dos de tres tandas.
Negativo	Si no se calcula la CI_{30} en dos de dos o dos de tres tandas.

43. Los criterios de interpretación de los datos figuran en los cuadros 7 y 8. Los resultados positivos se caracterizarán tanto por la magnitud del efecto como por la concentración a la que se produce el efecto. Ambos objetivos se alcanzan mediante la expresión de los resultados como la concentración a la que se alcanza un 50 % (CP_{50}) o un 10 % (CP_{10}) de los valores del TP en el ensayo de agonistas, y el 50 % (CI_{50}) o el 30 % (CI_{30}) del valor del control con el testigo añadido en el ensayo de antagonistas. Sin embargo, se determina que un producto problema es positivo si la respuesta máxima inducida por el producto problema

es igual o superior al 10 % de la respuesta del TP en al menos dos de dos o dos de tres tandas, mientras que un producto problema se considera negativo si la $RCP_{Máx}$ no alcanza al menos el 10 % de la respuesta del testigo positivo en dos de dos o dos de tres tandas.

44. Los cálculos de CP_{10} , CP_{50} y $CP_{Máx}$ en el ensayo de agonistas ER, y CI_{30} y CI_{50} en el ensayo de antagonistas ER pueden efectuarse utilizando una hoja de cálculo disponible con las directrices de ensayo en el sitio web público de la OCDE¹.
45. Debe ser suficiente con obtener los valores CP_{10} o CP_{50} y CI_{30} o CI_{50} al menos dos veces. Sin embargo, si los valores resultantes de referencia para los datos en el mismo intervalo de concentraciones presenta variabilidad con un coeficiente de variación inaceptablemente elevado (CV; %), los datos no se pueden considerar fiables y debe identificarse la fuente de esa elevada variabilidad. El CV de los datos brutos triplicados (es decir, datos de intensidad de la luminiscencia) de los puntos de datos que se utilizan para el cálculo del valor de CP_{10} debe ser inferior al 20 %.
46. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad indica que el sistema de ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La duplicación de los resultados de la primera tanda es la mejor garantía de que se han producido datos exactos.
47. En el caso de un ensayo de agonistas ER, cuando se requiere más información adicional a los objetivos de cribado y priorización de las presentes TG con respecto a los productos problema positivos, especialmente productos CP_{10} - CP_{49} , así como productos sospechosos de sobreestimular la luciferasa; puede confirmarse que la actividad de luciferasa observada es únicamente una respuesta específica del $ER\alpha$, utilizando un antagonista $ER\alpha$ (véase el apéndice 2.1).

INFORME DEL ENSAYO

48. Véase el punto 20 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA”.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
- (6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
- (7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Apéndice 2.1

FALSOS POSITIVOS: EVALUACIÓN DE LAS SEÑALES DE LUMINISCENCIA NO MEDIADAS POR EL RECEPTOR

1. Los falsos positivos en el ensayo de agonistas ER pueden generarse debido a la activación del gen de la luciferasa no mediada por el ER, o bien debido a la activación directa del producto génico o a fluorescencia no relacionada. Estos efectos se indican mediante una curva dosis-respuesta incompleta o inusual. Si se sospechan tales efectos, debe examinarse el efecto que tiene sobre la respuesta un antagonista ER [p. ej., 4-hidroxitamoxifeno (OHT) a una concentración no tóxica]. El antagonista puro ICI 182780 puede no ser adecuado para este fin, ya que una concentración suficiente de ICI 182780 puede reducir el valor del C_{Ve}, lo que afectará al análisis de los datos.
2. Para garantizar la validez de este enfoque, debe someterse a ensayo lo siguiente en la misma placa:
 - actividad agonista del producto desconocido sin/con solución 10 μ M de OHT
 - C_{Ve} (por triplicado)
 - OHT (por triplicado)
 - solución 1 nM de E2 (por triplicado) como TP agonista
 - solución 1 nM de E2 + OHT (por triplicado).

Criterios de interpretación de los datos

Nota: Todos los pocillos deben tratarse con la misma concentración del vehículo.

- Si la actividad agonista del producto desconocido NO se ve afectada por el tratamiento con antagonista ER, se clasifica como “negativo”.
- Si se inhibe completamente la actividad agonista del producto desconocido, deben aplicarse los criterios de decisión.
- Si la actividad agonista a la concentración más baja es igual o superior a la respuesta CP₁₀, el producto desconocido se inhibe en una medida igual o superior a la respuesta CP₁₀. Se calcula la diferencia en las respuestas entre los pocillos no tratados y los pocillos tratados con el antagonista ER, y esta diferencia debe considerarse como la respuesta verdadera y debe utilizarse en el cálculo de los parámetros adecuados para permitir la adopción de una decisión de clasificación.

Análisis de los datos

Comprobar la norma de comportamiento.

Comprobar el CV entre los pocillos tratados en las mismas condiciones.

1. Calcular el valor medio del CVE.
2. Restar la media del CVE de los valores de cada pocillo **no** tratado con OHT.
3. Calcular el valor medio de OHT.
4. Restar la media del CVE de los valores de cada pocillo tratado con OHT.
5. Calcular el valor medio del TP.
6. Calcular la actividad transcripcional relativa de todos los demás pocillos respecto al TP.

Apéndice 2.2

PREPARACIÓN DE SUERO TRATADO CON CARBÓN RECUBIERTO DE DEXTRANO (DCC)

1. El tratamiento de suero con carbón recubierto de dextrano (DCC) es un método general para la eliminación de los compuestos estrogénicos del suero que se añade al medio celular, con el fin de excluir una respuesta sesgada asociada a la presencia residual de estrógenos en el suero. Pueden tratarse mediante este procedimiento 500 ml de suero bovino fetal (FBS).

Componentes

2. Se necesitan los siguientes materiales y equipo:

Materiales

Carbón activo

Dextrano

Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)

Sacarosa

Solución amortiguadora HEPES 1 M (pH 7,4)

Agua ultrapura producida a partir de un sistema de filtro

Equipo

Centrífuga general de laboratorio con recipientes de vidrio esterilizados en autoclave (el tamaño debe ajustarse según proceda), que pueda fijar la temperatura a 4 °C

Procedimiento

3. Se ajusta el siguiente procedimiento para la utilización de tubos de centrifuga de 50 ml:

[Día-1] Preparar la suspensión de carbón recubierto de dextrano con 1 l de agua ultrapura con MgCl_2 1,5 mM, sacarosa 0,25 M, 2,5 g de carbón vegetal, 0,25 g de dextrano y HEPES 5 mM, y agitar a 4 °C durante la noche.

[Día-2] Poner la suspensión en tubos de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante y conservar la mitad del sedimento de carbón vegetal a 4 °C para su uso el día-3. Suspender la otra mitad del carbón vegetal con FBS que se ha descongelado suavemente para evitar la precipitación y se ha inactivado a 56 °C durante 30 minutos; transferir después a un recipiente de vidrio esterilizado en autoclave, como por ejemplo un matraz Erlenmeyer. Agitar suavemente esta suspensión a 4 °C durante la noche.

[Día-3] Poner la suspensión con FBS en tubos de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Recoger el FBS y transferirlo al nuevo sedimento de carbón vegetal preparado y conservado el día-2. Suspende el sedimento de carbón vegetal y agitar suavemente esta suspensión en un recipiente de vidrio esterilizado en autoclave, a una temperatura de 4 °C durante la noche.

[Día-4] Disponer la suspensión para su centrifugación a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y esterilizar el sobrenadante mediante filtración a través de un filtro estéril de 0,2 µm. Este DCC-FBS debe conservarse a - 20 °C y se puede utilizar durante un máximo de un año.

APÉNDICE 3

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO PARA IDENTIFICAR LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO CON VM7LUC

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo utiliza la línea celular VM7Luc4E2¹. Ha sido validado por el Centro Interagencias del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativo (National Toxicology Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM), y el Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). Las líneas celulares VM7Luc expresan predominantemente el receptor ER α endógeno y una pequeña cantidad de ER β endógeno (2) (3) (4).
2. Este ensayo es aplicable a una amplia gama de sustancias, a condición de que puedan disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO; n.º CAS 67-68-5), no reaccionen con el DMSO ni con el medio de cultivo celular y no sean citotóxicas a las concentraciones utilizadas en el ensayo. Si el uso de DMSO no es posible, podrá emplearse otro vehículo, como etanol o agua (véase el punto 12). El comportamiento demostrado del ensayo de (ant)agonistas VM7Luc ER TA indica que los datos generados con este ensayo pueden dar información sobre los mecanismos de actuación mediados por el ER y podrían tenerse en cuenta a la hora de asignar prioridad a las sustancias para someterse a ensayos adicionales.
3. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la TA mediada a través del hER α y el hER β midiendo la quimioluminiscencia como parámetro. La utilización de la

¹ Hasta junio de 2016, esta línea celular se designaba BG1Luc. Las células BG-1 fueron descritas inicialmente por Geisinger *et al.* (1998) (12) y fueron caracterizadas más tarde por investigadores del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental de EE. UU. (Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS) (13). Hace relativamente poco tiempo, se ha descubierto que existen dos variantes diferentes de las células BG-1 que utilizan los investigadores, la BG-1 Fr y la BG-1 NIEHS. Un análisis en profundidad, con ensayos de ADN, de las dos variantes de las líneas celulares BG-1 llevado a cabo por Li y colaboradores (2014) (14) puso de manifiesto que la BG-1 Fr era única y que la BG-1 NIEHS, es decir, la línea celular original utilizada para elaborar el ensayo, no era la línea celular BG1 de carcinoma de ovario humano, sino que era en su lugar una variante de la línea celular MCF7 del cáncer de mama humano. La línea celular utilizada en el ensayo, anteriormente denominada BG1Luc4E2 (15), se designa ahora como VM7Luc4E2 (“V” = variante; “M7” = células MCF7). Asimismo, el ensayo se designa ahora como VM7Luc ER TA. Aunque esto cambia el origen de la línea celular en la que se basa el ensayo, no afecta a los estudios de validación publicados ni a la utilidad y aplicación de este ensayo para detectar productos con efectos estrogénicos/antiestrogénicos.

quimioluminiscencia en bioensayos está extendida porque la luminiscencia presenta una alta relación de señal a fondo (10). Sin embargo, la actividad de la luciferasa de luciérnaga en ensayos celulares puede confundirse por la presencia de sustancias que inhiben la luciferasa, lo que provoca una inhibición aparente o un aumento de la luminiscencia debido a la estabilización de la proteína (10). Sin embargo, en algunos ensayos de gen marcador de ER a base de luciferasa se han comunicado señales de luminiscencia no mediadas por el receptor a concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μ M como consecuencia de la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa (9) (11). Si bien la curva dosis-respuesta indica que la activación real del sistema ER se produce a concentraciones más bajas, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos similares sospechosos de producir una sobreactivación de tipo fitoestrogénico del gen marcador de la luciferasa, en los sistemas de ensayo ER TA transfectados de forma estable (véase el apéndice 2).

4. Las secciones “INTRODUCCIÓN GENERAL” y “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El ensayo se utiliza para indicar la unión de un ligando al ER, seguida por la translocación del complejo receptor-ligando al núcleo. En el núcleo, el complejo receptor-ligando se une a elementos específicos de respuesta de ADN y transactiva el gen marcador (*luc*), lo que da lugar a la producción de luciferasa y a la consiguiente emisión de luz, que puede cuantificarse utilizando un luminómetro. La actividad de la luciferasa puede evaluarse de forma rápida y poco costosa con varios equipos de pruebas disponibles en el comercio. El VM7Luc ER TA utiliza una línea celular de adenocarcinoma de mama humana sensible al ER, la línea VM7, que se ha transfectado de forma estable con una construcción del marcador *luc* de la luciérnaga bajo el control de cuatro elementos de respuesta estrogénica situados en dirección 5' respecto al promotor vírico del tumor de mama del ratón (MMTV), a fin de detectar sustancias con actividad agonista o antagonista ER *in vitro*. El promotor MMTV muestra reactividad cruzada solo de pequeña intensidad con otras hormonas esteroideas y no esteroideas (8). Los criterios para la interpretación de los datos se describen con detalle en el punto 41. En síntesis, una respuesta positiva se identifica mediante una curva concentración-respuesta que contiene al menos tres puntos con barras de error no solapadas (media $\pm$ DT), así como un cambio en la amplitud [unidad luminosa relativa normalizada (ULR)] de al menos el 20 % del valor máximo del patrón de referencia [17β -estradiol (E2; n.º CAS 50-28-2)] en el caso del ensayo de agonistas, clorhidrato de raloxifeno [Ral; n.º CAS 84449 -90 -1]/E2 en el caso del ensayo de antagonistas).

PROCEDIMIENTO

Línea celular

6. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular VM7Luc4E2, transfectada de forma estable. En la actualidad, solo se puede conseguir la línea celular mediante un acuerdo de licencia técnica en la Universidad de California, Davis, California, EE. UU.¹, y en Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Carolina del Norte, EE. UU.².

Estabilidad de la línea celular

7. Para mantener la estabilidad e integridad de la línea celular, las células deben cultivarse en medio de mantenimiento celular a lo largo de más de un pase a partir del cultivo madre congelado (véase el punto 9). Las células no se deben cultivar a lo largo de más de treinta pases. En el caso de la línea celular VM7Luc4E2, treinta pases serán aproximadamente tres meses.

Condiciones de cultivo y siembra de las células

8. Deben seguirse los procedimientos especificados en las Orientaciones sobre buenas prácticas en materia de cultivo de células (5) (6) para garantizar la calidad de todos los materiales y métodos con el fin de mantener la integridad, validez y reproducibilidad de los trabajos realizados.
9. Las células VM7Luc4E2 se mantienen en el medio RPMI 1640 complementado con 0,9 % de Pen-Strep y 8,0 % de suero bovino fetal (FBS) en una incubadora de cultivos tisulares aparte, a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad del $90\% \pm 5\%$ y un contenido de CO_2 en el aire del $5,0\% \pm 1\%$.
10. Al llegar al $\sim 80\%$ de confluencia, las células VM7Luc4E2 se subcultivan y se ponen en un medio libre de estrógenos durante 48 horas antes de sembrarlas en placas de 96 pocillos para exponerlas a los productos problema y analizar la inducción de la actividad de la luciferasa en función de los estrógenos. El medio libre de estrógenos (EFM) contiene la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM), sin rojo de fenol, complementado con 4,5 % de FBS tratado con carbón/dextrano, 1,9 % de L-glutamina y 0,9 % de Pen-Strep. Todo el

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, correo electrónico: msdenison@ucdavis.edu, teléfono: (530) 754-8649.

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, correo electrónico: info@dioxins.com, teléfono: 919-688-4804, fax: 919-688-4404.

material de plástico debe estar libre de actividad estrogénica [véase el protocolo detallado (7)].

Criterios de aceptabilidad

11. La aceptación o el rechazo de un ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con los patrones de referencia y los testigos en cada experimento realizado con una placa de 96 pocillos. Cada patrón de referencia se somete a ensayo a diversas concentraciones y hay varias muestras de cada concentración de patrón de referencia y de testigo. Se comparan los resultados con los controles de calidad en relación con estos parámetros derivados de las bases de datos históricos de agonistas y de antagonistas generadas por cada laboratorio durante la demostración de la competencia. Las bases de datos históricos se actualizan continuamente con valores de los patrones de referencia y de los testigos. Los cambios en el equipo o en las condiciones de laboratorio pueden requerir la actualización de las bases de datos históricos.

Ensayo de agonistas

Ensayo de determinación del intervalo

- Inducción: La inducción en la placa se mide dividiendo el valor medio más alto de unidades luminosas relativas (ULR) del patrón de referencia E2 por el valor medio de ULR del testigo de DMSO. Se alcanza por lo general un factor de inducción de cinco pero, a efectos de aceptación, dicho factor de inducción debe ser superior o igual a cuatro.
- Resultados del control de DMSO: Los valores de ULR del control del disolvente deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del control del disolvente.
- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Ensayo completo

Incluye los criterios de aceptabilidad del ensayo de determinación del intervalo de agonistas y los siguientes:

- Resultados con el patrón de referencia: La curva concentración-respuesta del patrón de referencia E2 debe ser de forma sigmoidea y tener al menos tres valores dentro de la porción lineal de la curva concentración-respuesta.
- Resultados del testigo positivo: Los valores de ULR del testigo de metoxicloro deben ser mayores que la media obtenida con el DMSO más el triple de la desviación típica respecto a dicha media.
- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Ensayo de antagonistas

Ensayo de determinación del intervalo

- Reducción: La reducción en la placa se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia Ral/E2 por el valor medio de ULR del testigo de DMSO. Se alcanza por lo general un factor de reducción de cinco pero, a efectos de aceptación, dicho factor de reducción debe ser superior o igual a tres.
- Resultados del testigo E2: Los valores de ULR del testigo de E2 deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del testigo de E2.
- Resultados del control de DMSO: Los valores de ULR del control de DMSO deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del control del disolvente.
- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Ensayo completo

Incluye los criterios de aceptación del ensayo de determinación del intervalo de antagonistas y los siguientes:

- Resultados con el patrón de referencia: La curva concentración-respuesta del patrón de referencia Ral/E2 debe ser de forma sigmoidea y tener al menos tres valores dentro de la porción lineal de la curva concentración-respuesta.
- Resultados del testigo positivo: Los valores de ULR del testigo de tamoxifeno/E2 deben ser menores que la media obtenida con el testigo de E2 menos el triple de la desviación típica respecto a dicha media.
- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Patrones de referencia, testigos positivos y controles de los vehículos

Control de los vehículos (ensayo de agonistas y antagonistas)

12. El vehículo que se utilice para disolver los productos problema debe someterse a ensayo como control del vehículo. El vehículo utilizado durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA fue la solución al 1 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, n.º CAS 67-68-5) (véase el punto 24). Si se utiliza un vehículo distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse en el mismo vehículo, si procede.

Patrón de referencia (determinación del intervalo de agonistas)

13. El patrón de referencia es el E2 (n.º CAS 50-28-2). Para los ensayos de determinación del intervalo, el patrón de referencia consiste en una serie de diluciones de cuatro concentraciones de E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ y $2,87 \times 10^{-12}$ M) y cada concentración se somete al ensayo en pocillos duplicados.

Patrón de referencia (ensayo completo de agonistas)

14. El E2 para el ensayo completo consiste en una serie de diluciones 1 : 2, compuesta por once concentraciones (desde $3,67 \times 10^{-10}$ hasta $3,59 \times 10^{-13}$ M) de E2 en pocillos duplicados.

Patrón de referencia (determinación del intervalo de antagonistas)

15. El patrón de referencia es una combinación de Ral (n.º CAS 84449-90-1) y E2 (n.º CAS 50-28-2). El Ral/E2 para los ensayos de determinación del intervalo consiste en una serie de diluciones de tres concentraciones de Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$, y $1,92 \times 10^{-10}$ M) más una concentración fija ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de E2 en pocillos duplicados.

Patrón de referencia (ensayo completo de antagonistas)

16. El Ral/E2 para los ensayos completos consiste en una serie de diluciones 1 : 2 de Ral (desde $2,45 \times 10^{-8}$ hasta $9,57 \times 10^{-11}$ M) más una concentración fija ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de E2, dando nueve concentraciones de Ral/E2 que se someten al ensayo en pocillos duplicados.

Testigo positivo débil (agonistas):

17. El testigo positivo débil es una disolución $9,06 \times 10^{-6}$ M de *p,p'*-metoxicloro (metoxicloro; n.º CAS 72-43-5) en EFM.

Testigo positivo débil (antagonistas):

18. El control positivo débil consiste en una disolución de tamoxifeno (n.º CAS 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M con E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M en EFM.

Testigo de E2 (ensayo de antagonistas solo)

19. El testigo de E2 consiste en una solución de E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M en EFM y se utiliza como testigo negativo de referencia.

Factor de inducción (agonistas)

20. La inducción de la actividad de luciferasa del patrón de referencia (E2) se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia E2 por el valor medio de ULR del control de DMSO, y el resultado debe ser mayor que cuatro.

Factor de reducción (antagonistas)

21. La actividad media de luciferasa del patrón de referencia (Ral/E2) se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia Ral/E2 por el valor medio de ULR del control de DMSO, y el resultado debe ser mayor que tres.

Demostración de la competencia del laboratorio (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” del presente método de ensayo)

Vehículo

22. Los productos problema deben disolverse en un disolvente que solubilice el producto problema y sea miscible con el medio celular. Son vehículos adecuados el agua, el etanol

(pureza del 95 % al 100 %) y el DMSO. Si se utiliza el DMSO, el nivel no debe superar el 1 % (v/v). Con cualquier vehículo, debe demostrarse que el volumen máximo utilizado no es citotóxico ni interfiere con el comportamiento del ensayo. Los patrones de referencia y los testigos se disuelven en disolvente del 100 % y, a continuación, se diluyen hasta las concentraciones adecuadas en EFM.

Preparación de los productos problema

23. Los productos problema se disuelven en DMSO (o el disolvente adecuado) del 100 % y, a continuación, se diluyen hasta las concentraciones adecuadas en EFM. Debe dejarse que todos los productos problema se estabilicen a temperatura ambiente antes de disolverse y diluirse. Las soluciones de los productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento. Las soluciones no deben presentar ningún precipitado ni turbidez apreciables. Las soluciones madre de los patrones de referencia y de los testigos pueden prepararse en gran cantidad; sin embargo, las diluciones finales de los patrones de referencia y de los testigos, así como los productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento y utilizarse en las 24 horas siguientes a la preparación.

Solubilidad y citotoxicidad: consideraciones para la determinación del intervalo de las dosis

24. El ensayo de determinación del intervalo de las dosis consiste en una tanda con siete diluciones en serie 1 : 10 por duplicado. Al principio, los productos problema se ensayan hasta la concentración máxima de 1 mg/ml (~ 1 mM) en las pruebas de agonistas y de 20 µg/ml (~ 10 µM) en las pruebas de antagonistas. Los experimentos de determinación del intervalo de las dosis se utilizan para determinar lo siguiente:
- Concentraciones iniciales del producto problema que deben utilizarse durante los ensayos completos,
 - Diluciones del producto problema (1 : 2 or 1 : 5) que deben utilizarse durante los ensayos completos.
25. En los protocolos de ensayo de agonistas y antagonistas (7) se incluye una evaluación de la viabilidad celular / citotoxicidad, que se incorpora en los ensayos de determinación del intervalo y en los ensayos completos. El método de citotoxicidad que se utilizó para evaluar la viabilidad celular durante la validación del VM7Luc ER TA (1) era un método de observación visual cualitativa en una serie graduada; sin embargo, puede utilizarse un método cuantitativo para la determinación de la citotoxicidad [véase el protocolo (7)]. No pueden utilizarse los datos de las concentraciones de producto problema que provoquen una reducción de la viabilidad superior al 20 %.

Exposición al producto problema y organización de la placa del ensayo

26. Se hace el recuento de las células y se siembran en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (2×10^5 células por pocillo) en EFM y se incuban durante 24 horas para que las células

puedan adherirse a la placa. Se retira el EFM; se ponen en su lugar los productos problema y de referencia en EFM, y se incuban durante 19-24 horas. Se debe prestar especial atención a las sustancias que son muy volátiles, ya que la proximidad de los pocillos de los testigos puede generar falsos resultados positivos. En tales casos, el uso de “selladores de placas” puede ayudar a aislar eficazmente los distintos pocillos durante el ensayo, por lo que resulta recomendable.

Ensayos de determinación del intervalo

27. Los ensayos de determinación del intervalo utilizan todos los pocillos de la placa de 96 pocillos para estudiar hasta seis productos problema, en una serie de siete diluciones 1 : 10 por duplicado (véanse las figuras 1 y 2).

- Las pruebas de determinación del intervalo de *agonistas* utiliza cuatro concentraciones de E2 por duplicado como patrón de referencia y cuatro pocillos replicados para el control de DMSO.
- Las pruebas de determinación del intervalo de *antagonistas* utiliza tres concentraciones de Ral/E2 con una concentración $9,18 \times 10^{-11}$ M de E2 por duplicado como patrón de referencia, y tres pocillos replicados para el testigo de E2 y el control de DMSO.

Figura 1: Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo de determinación del intervalo de agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	CVe	CVe	CVe	CVe	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abreviaturas: E2-1 a E2-4 = concentraciones del patrón de referencia E2 (de altas a bajas); TC1-1 a TC1-7 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-7 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); TC3-1 a TC3-7 = concentraciones del producto problema 3 (TC3) (de altas a bajas); TC4-1 a TC4-7 = concentraciones del producto problema 4 (TC4) (de altas a bajas); TC5-1 a TC5-7 = concentraciones del producto problema 5 (TC5) (de altas a bajas); TC6-1 a TC6-7 = concentraciones del producto problema 6 (TC6) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo [DMSO (1 % v/v en EFM)].

Figura 2: Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo de determinación del intervalo de antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	CVe	CVe	CVe	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abreviaturas: E2 = testigo E2; Ral-1 a Ral-3 = concentraciones del patrón de referencia raloxifeno/E2 (de altas a bajas); TC1-1 a TC1-7 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-7 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); TC3-1 a TC3-7 = concentraciones del producto problema 3 (TC3) (de altas a bajas); TC4-1 a TC4-7 = concentraciones del producto problema 4 (TC4) (de altas a bajas); TC5-1 a TC5-7 = concentraciones del producto problema 5 (TC5) (de altas a bajas); TC6-1 a TC6-7 = concentraciones del producto problema 6 (TC6) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo (DMSO [1 % v/v en EFM]).

Nota: Todos los productos problema se someten a ensayo en presencia de E2 a la concentración de $9,18 \times 10^{-11}$ M.

28. El volumen final recomendado de medio necesario para cada pocillo es de 200 μ l. Deben utilizarse únicamente placas de ensayo en las que las células de todos los pocillos tengan una viabilidad igual o superior al 80 %.
29. En el protocolo de agonistas (7) se describe la determinación de las concentraciones iniciales de los ensayos completos de **agonistas**. En resumen, se utilizan los siguientes criterios:
- Si en la curva de concentración del producto problema no hay puntos que sean superiores a la media más tres veces la desviación típica del control de DMSO, se realizará un ensayo completo utilizando una dilución en serie 1 : 2 con once puntos empezando a la concentración soluble máxima.
 - Si en la curva de concentración del producto problema hay puntos que sean superiores a la media más tres veces la desviación típica del control de DMSO, la concentración inicial que se utilizará para la serie de diluciones con once puntos en el ensayo completo debe ser una unidad logarítmica superior a la concentración que dé el mayor valor de ULR ajustado en la determinación del intervalo. La serie de diluciones con once puntos se debe basar en la relación 1 : 2 o 1 : 5, con arreglo a los criterios siguientes:

Se debe utilizar una serie de diluciones con once puntos en la relación 1 : 2 en caso de que el intervalo de concentraciones resultante abarque toda la gama de respuestas según la curva concentración-respuesta generada en el ensayo de determinación del intervalo. En caso contrario, debe utilizarse una relación de dilución de 1 : 5.
 - Si un producto problema presenta una curva de respuesta bifásica en el ensayo de determinación del intervalo, ambas fases deben también incluirse en el ensayo completo.
30. En el protocolo de antagonistas (7) se describe la determinación de las concentraciones iniciales de los ensayos completos de **antagonistas**. En resumen, se utilizan los siguientes criterios:
- Si en la curva de concentración del producto problema no hay puntos que sean inferiores a la media menos tres veces la desviación típica del testigo de E2, se realizará un ensayo completo utilizando una serie de diluciones con once puntos en la relación 1 : 2 empezando a la concentración soluble máxima.
 - Si en la curva de concentración del producto problema hay puntos que sean inferiores a la media menos tres veces la desviación típica del testigo de E2, la concentración inicial que se utilizará para la serie de diluciones con once puntos en el ensayo completo debe ser una de las siguientes:
 - la concentración que proporciona el valor de ULR ajustado más bajo en el ensayo de determinación del intervalo,

- la concentración soluble máxima [véase el protocolo de antagonistas (7), figura 14-2],
 - la concentración citotóxica mínima [véase un ejemplo relacionado en el protocolo de antagonistas (7), figura 14-3].
- La serie de once diluciones se debe basar en la relación 1 : 2 o 1 : 5, con arreglo a los criterios siguientes:

Se debe utilizar una serie de diluciones con once puntos en la relación 1 : 2 en caso de que el intervalo de concentraciones resultante abarque toda la gama de respuestas según la curva concentración-respuesta generada en el ensayo de determinación del intervalo. En caso contrario, debe utilizarse una relación de dilución de 1 : 5.

Ensayos completos

31. El ensayo completo se compone de una serie de once diluciones (en la relación 1 : 2 o 1 : 5 diluciones a partir de la concentración inicial según los criterios de ensayo completo), y cada concentración se somete a ensayo en pocillos triplicados de la placa de 96 pocillos (véanse las figuras 3 y 4).
- El ensayo completo de *agonistas* utiliza once concentraciones de E2 por duplicado como patrón de referencia. Se incluyen en cada placa cuatro pocillos replicados del control de DMSO y cuatro pocillos replicados del control de metoxicloro (a la concentración de $9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - El ensayo completo de *antagonistas* utiliza nueve concentraciones de Ral/E2 con una concentración de E₂ de $9,18 \times 10^{-11}$ M por duplicado como patrón de referencia, con cuatro pocillos replicados para el testigo E2 a la concentración de $9,18 \times 10^{-11}$ M, cuatro pocillos replicados para los controles de DMSO, y cuatro pocillos replicados para el tamoxifeno a la concentración de $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Figura 3: Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo completo de agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	CVe
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Abreviaturas: TC1-1 a TC1-11 = concentraciones del producto problema 1 (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-11 = concentraciones del producto problema 2 (de altas a bajas); E2-1 a E2-11 = concentraciones del patrón de referencia E2 (de altas a bajas); Met = *p,p'*-metoxicloro, testigo positivo débil; CVe = disolución de DMSO en EFM al 1 % v/v, control del vehículo

Figura 4: Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo completo de antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	CVe
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	CVe
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abreviaturas: E2 = testigo E2; Ral-1 a Ral-9 = concentraciones del patrón de referencia raloxifeno/E2 (de altas a bajas); Tam = tamoxifeno/E2, control positivo débil; TC1-1 a TC1-11 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-11 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo (DMSO [1 % v/v en EFM]).

Nota: Como se indica, todos los pocillos de referencia y de ensayo contienen una concentración fija de E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. La repetición de los ensayos completos con el mismo producto debe hacerse en días distintos, a fin de garantizar su independencia. Deben realizarse al menos dos ensayos completos. Si los resultados de los ensayos se contradicen (por ejemplo, un ensayo es positivo y el otro negativo), o si uno de ellos es inadecuado, se realizará un tercer ensayo adicional.

Medición de la luminiscencia

33. Se mide la luminiscencia en el intervalo de 300 a 650 nm, utilizando un luminómetro de inyección y programas informáticos que controlen el volumen de inyección y el intervalo de medición (7). La emisión de luz de cada pocillo se expresa como ULR por pocillo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Determinación de la CE_{50}/CI_{50}

34. El valor de la CE_{50} [concentración de producto problema que produce la mitad del efecto máximo (agonistas)] y el valor de la CI_{50} [concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima (antagonistas)] se determinan a partir de los datos de concentración-respuesta. En el caso de productos problema que sean positivos a una o más concentraciones, la concentración del producto problema que causa la mitad de la respuesta máxima (CI_{50} o CE_{50}) se calcula utilizando un análisis de función de Hill o una alternativa adecuada. La función de Hill consiste en un modelo matemático logístico de cuatro parámetros que relaciona la concentración del producto problema con la respuesta (por lo general, según una curva sigmoidea) utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = Valor\ inferior + \frac{(Valor\ superior - Valor\ inferior)}{1 + 10^{(lg\ CE_{50} - X) \text{ Pendiente de Hill}}}$$

donde:

Y = respuesta (es decir, ULR);

X = logaritmo de la concentración;

Valor inferior = respuesta mínima;

Valor superior = respuesta máxima;

$lg\ CE_{50}$ (o $lg\ CI_{50}$ = logaritmo de X como respuesta intermedia entre el valor superior y el valor inferior;

Pendiente de Hill = pendiente de la curva.

El modelo calcula el mejor ajuste de los parámetros valor superior, valor inferior, pendiente de Hill, y CI_{50} y CE_{50} . Para el cálculo de los valores CI_{50} y CE_{50} , deben utilizarse programas informáticos estadísticos adecuados (por ejemplo, los de Graphpad Prism^R).

Determinación de los valores atípicos

35. Podría facilitarse un buen juicio estadístico si se incluyera el test Q (pero sin limitarse a este) [véanse los protocolos de agonistas y de antagonistas (7) para determinar los pocillos “inutilizables” que se excluirán del análisis de los datos].
36. En el caso de las réplicas del patrón de referencia E2 (tamaño de la muestra de dos), se considerará que un valor de ULR ajustado correspondiente a una réplica a una concentración dada de E2 es atípico si su valor es superior o inferior en más del 20 % al valor de ULR ajustado a esa concentración en la base de datos históricos.

Recogida y ajuste de los datos del luminómetro correspondientes al ensayo de determinación del intervalo

37. Los datos brutos del luminómetro deben transferirse a una hoja de cálculo diseñada para el ensayo. Debe determinarse si hay puntos de datos atípicos que hayan de eliminarse. (Véanse los criterios de aceptación del ensayo en relación con los parámetros que se determinan en los análisis). Deben llevarse a cabo los siguientes cálculos:

Agonista

- Fase 1 Calcular el valor medio del control del vehículo de DMSO (C_{Ve}).
- Fase 2 Restar el valor medio del C_{Ve} de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.
- Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (E₂).
- Fase 4 Calcular el valor medio de CE₅₀ de los productos problema.

Antagonista

- Fase 1 Calcular el valor medio del C_{Ve} de DMSO.
- Fase 2 Restar el valor medio del C_{Ve} de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.
- Fase 3 Calcular el factor medio de reducción del patrón de referencia (R_{al}/E₂).
- Fase 4 Calcular el valor medio del patrón de referencia E₂.
- Fase 5 Calcular el valor medio de CI₅₀ de los productos problema.

Recogida y ajuste de los datos del luminómetro correspondientes al ensayo completo

38. Los datos brutos del luminómetro deben transferirse a una hoja de cálculo diseñada para el ensayo. Debe determinarse si hay puntos de datos atípicos que hayan de eliminarse. (Véanse los criterios de aceptación del ensayo en relación con los parámetros que se determinan en los análisis). Deben llevarse a cabo los siguientes cálculos:

Agonista

- Fase 1 Calcular el valor medio del C_{Ve} de DMSO.
- Fase 2 Restar el valor medio del C_{Ve} de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.
- Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (E₂).
- Fase 4 Calcular el valor medio de CE₅₀ de E₂ y los productos problema.
- Fase 5 Calcular el valor de ULR medio ajustado del metoxicloro.

Antagonista

- Fase 1 Calcular el valor medio del C_{Ve} de DMSO.
- Fase 2 Restar el valor medio del C_{Ve} de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.
- Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (R_{al}/E₂).

- Fase 4 Calcular el valor medio de CI_{50} de Ral/E2 y los productos problema.
 Fase 5 Calcular el valor de ULR medio ajustado del tamoxifeno.
 Fase 6 Calcular el valor medio del patrón de referencia E2.

Criterios de interpretación de los datos

39. El VM7Luc TE TA se entiende como parte de un enfoque de ponderación de las pruebas para ayudar a asignar prioridades a las sustancias para el ensayo de la alteración endocrina *in vivo*. Parte de este procedimiento de asignación de prioridades será la clasificación del producto problema como positivo o negativo en cuanto a la actividad como agonista o antagonista del ER. Los criterios de decisión como producto positivo o negativo utilizados en el estudio de validación VM7Luc ER TA se describen en el cuadro 1.

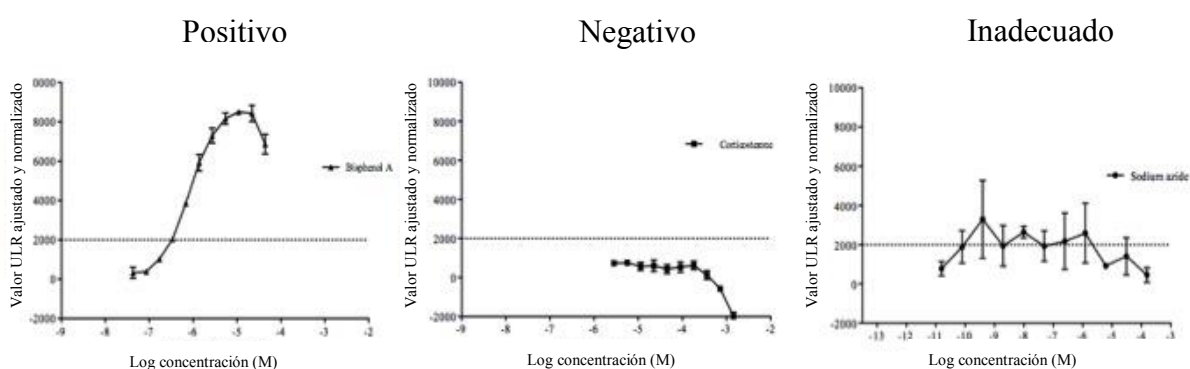
Cuadro 1: Criterios de decisión como producto positivo o negativo

ACTIVIDAD COMO AGONISTA	
Positivo	- Todos los productos problema clasificados como <i>positivos</i> en cuanto a la actividad como agonista del ER deben presentar una curva concentración-respuesta que consista en una línea de base, seguida de una pendiente positiva, y que se concluya en una meseta o pico. En algunos casos, pueden estar definidas solo dos de estas características (línea de base - pendiente, o pendiente - pico). - La línea que define la pendiente positiva debe contener al menos tres puntos con barras de error no solapadas ($media \pm DT$). Se excluyen los puntos que forman la línea de base, pero la parte lineal de la curva puede incluir el pico o el primer punto de la meseta. - Una clasificación como producto positivo requiere una amplitud de respuesta (la diferencia entre la línea de base y el pico) de al menos el 20 % del valor máximo del patrón de referencia, E2 [es decir, 2 000 ULR o más cuando el valor de la respuesta máxima del patrón de referencia (E2) se ajusta a 10 000 ULR]. - Si es posible, deberá calcularse un valor de la CE_{50} para cada producto problema positivo.
Negativo	El valor de ULR ajustado medio para una concentración dada es igual o inferior a valor de ULR medio del control de DMSO más el triple de la desviación típica del valor de ULR del DMSO.
Inadecuado	Se considera que los datos que no pueden interpretarse como válidos para demostrar la presencia o la ausencia de actividad por limitaciones cualitativas o cuantitativas importantes son inadecuados y no pueden utilizarse para determinar si el producto problema es positivo o negativo. Los productos deben someterse a ensayo de nuevo.
ACTIVIDAD COMO ANTAGONISTA	

Positivo	- Los datos del producto problema producen una curva concentración-respuesta que consiste en una línea de base, a la que sigue una pendiente negativa. - La línea que define la pendiente negativa debe contener al menos tres puntos con barras de error no solapadas; se excluyen los puntos que forman la línea de base, pero la parte lineal de la curva puede incluir el primer punto de la meseta. - Debe haber al menos una reducción del 20 % en la actividad respecto al valor máximo del patrón de referencia, Ral/E2 (es decir, 8 000 ULR o menos cuando el valor de la respuesta máxima del patrón de referencia (Ral/E2) se ajusta a 10 000 ULR). - Las concentraciones no citotóxicas más altas del producto problema deben ser inferiores o iguales a 1×10^{-5} M. - Si es posible, deberá calcularse un valor de la CI_{50} para cada producto problema positivo.
Negativo	Todos los puntos de datos se sitúan por encima del valor CE_{80} (80 % de la respuesta del E2 u 8 000 ULR), a concentraciones inferiores a $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Inadecuado	Se considera que los datos que no pueden interpretarse como válidos para demostrar la presencia o la ausencia de actividad por limitaciones cualitativas o cuantitativas importantes son inadecuados y no pueden utilizarse para determinar si el producto problema es positivo o negativo. El producto debe someterse a ensayo de nuevo.

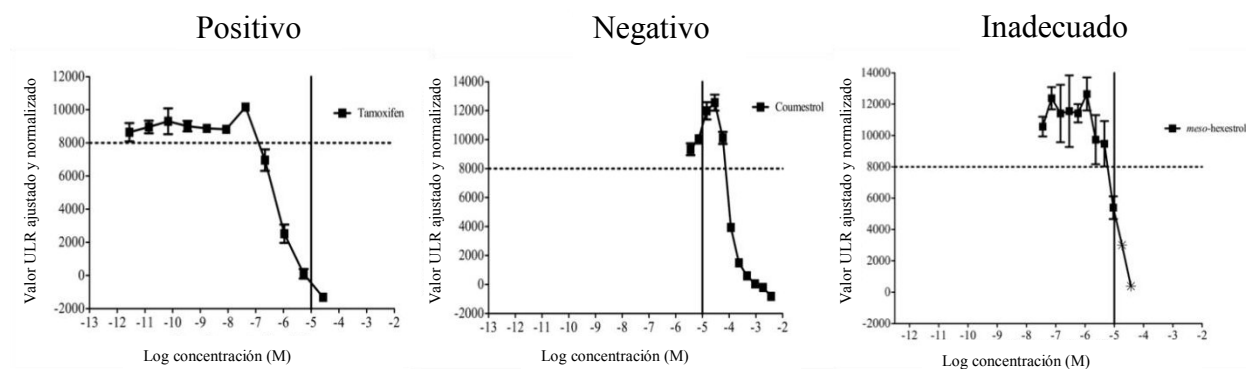
40. Los resultados positivos se caracterizarán tanto por la magnitud del efecto como por la concentración a la que se produce el efecto, cuando sea posible. En las [figuras 5 y 6](#) se muestran ejemplos de datos positivos, negativos e inadecuados.

Figura 5: Ejemplos de agonistas: datos positivos, negativos e inadecuados



La línea discontinua indica el 20 % de la respuesta del E2, 2 000 ULR ajustadas y normalizadas.

Figura 6: Ejemplos de antagonistas: datos positivos, negativos e inadecuados



La línea discontinua indica el 80 % de la respuesta del Ral/E2, 8 000 ULR ajustadas y normalizadas.

La línea continua indica $1,00 \times 10^{-5}$ M. Para que una respuesta se considere positiva, debe estar por debajo de la línea de 8 000 ULR y a concentraciones inferiores a $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Las concentraciones indicadas con asteriscos en la gráfica del meso-hexestrol indican unas puntuaciones de viabilidad iguales o superiores a “2”.

Se considera que los resultados de los ensayos del ensayo correspondientes al meso-hexestrol son inadecuados porque la única respuesta que se encuentra por debajo de 8 000 ULR se da a la concentración de $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Los cálculos de CE_{50} y CI_{50} pueden hacerse utilizando una función de Hill de cuatro parámetros [véanse más detalles en el protocolo de agonistas y en el de antagonistas (7)]. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad indica que el sistema funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La duplicación de los resultados de la primera tanda es la mejor garantía de que se han producido datos exactos (véase el punto 19 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA”.

INFORME DEL ENSAYO

42. Véase el punto 20 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA”.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): p. 270-273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: p. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646-57.

- (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

APÉNDICE 4

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO A HUMANO TRANSFECTADO ESTABLEMENTE PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA Y ANTAGONISTA DE LOS PRODUCTOS, UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR ERA CALUX

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de transactivación ER α CALUX utiliza la línea celular U2OS humana para detectar la actividad de agonistas y antagonistas estrogénicos mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hER α). El estudio de validación del bioensayo ER α CLUX con transfección estable realizado por BioDetection Systems BV (Amsterdam, Países Bajos) puso de manifiesto la pertinencia y la fiabilidad del ensayo para su finalidad prevista (1). La línea celular ER α CALUX expresa solo el ER α humano con transfección estable (2) (3).
2. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la transactivación mediada a través del hER α midiendo la bioluminiscencia como parámetro. La bioluminiscencia se utiliza normalmente en los bioensayos debido a la alta relación señal-ruido (4).
3. Se ha notificado que las concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μ M sobreactivan el gen marcador de la luciferasa, lo que da lugar a una luminiscencia no mediada por el receptor (5) (6) (7). Por tanto, en los ensayos de transactivación del ER con transfección estable hay que examinar cuidadosamente las concentraciones más elevadas de fitoestrógenos u otros compuestos similares que puedan sobreactivar la expresión de la luciferasa (véase el apéndice 2).
4. Las secciones “INTRODUCCIÓN GENERAL” y “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El bioensayo se utiliza para evaluar la unión de un ligando al ER, seguida por la translocación del complejo receptor-ligando al núcleo. En el núcleo, el complejo receptor-ligando se une a determinados elementos específicos de respuesta del ADN y transactiva un gen marcador de la luciferasa de la luciérnaga, lo que provoca un aumento de la expresión celular de la enzima luciferasa. Como consecuencia de la adición del sustrato de la luciferasa, que es la luciferina, esta se transforma en un producto bioluminiscente. La luz producida puede detectarse y cuantificarse fácilmente con un luminómetro.

6. El sistema de ensayo utiliza células CALUX transfectadas de forma estable. Las células ER α CALUX proceden de la línea celular U2OS de osteosarcoma osteoblástico humano. Las células U2OS humanas se han transfectado de forma estable con 3 x HRE-TAT-Luc y pSG5-neo-hER α utilizando el método de coprecipitación con fosfato de calcio. Se ha seleccionado la línea celular U2OS como el mejor candidato para servir de línea celular marcadora sensible a los estrógenos (y a otras hormonas esteroideas), basándose en la observación de que la línea celular U2OS mostraba poca o ninguna actividad de receptores endógenos. La ausencia de receptores endógenos se evaluó utilizando únicamente plásmidos de marcador de luciferasa, sin que se pusiera de manifiesto actividad alguna cuando se añadían los ligandos de los receptores. Además, esta línea celular permitía fuertes respuestas medidas por hormonas, cuando se introducían con carácter transitorio receptores análogos (2) (3) (8).
7. El ensayo de productos para detectar su actividad estrogénica o antiestrogénica utilizando la línea celular ER α CALUX incluye una tanda de precubado y unas tandas completas. Durante la tanda de precubado se determina la solubilidad, la citotoxicidad y el intervalo afinado de concentraciones para el ensayo completo. Durante las tandas completas, se someten a ensayo los intervalos afinados de concentración de los productos problema según el bioensayo ER α CALUX, seguido de la clasificación de los productos problema en cuanto a su agonismo o antagonismo.
8. Los criterios para la interpretación de los datos se describen con detalle en el punto 59. En resumen, el producto problema se considera positivo como agonista en el caso de que al menos dos concentraciones consecutivas suyas muestren una respuesta igual o superior al 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia 17 β -estradiol (CP₁₀). El producto problema se considera positivo como antagonista en el caso de que al menos dos concentraciones consecutivas suyas muestren una respuesta igual o inferior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia tamoxifeno (CP₈₀).

PROCEDIMIENTO

Línea celular

9. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular ER α CALUX de U2OS, transfectada de forma estable. La línea celular puede obtenerse de BioDetection Systems BV, Amsterdam, Países Bajos, mediante un acuerdo de licencia técnica.
10. Solo deben utilizarse cultivos celulares libres de micoplasmas. Los lotes usados de células deben estar certificados como negativos en cuanto a la contaminación por micoplasmas, o bien antes de su uso debe llevarse a cabo un ensayo para excluir la presencia de estos. Debe utilizarse la RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) para la detección sensible de la infección por micoplasmas (9).

Estabilidad de la línea celular

11. Para mantener la estabilidad y la integridad de las células CALUX, deben conservarse en nitrógeno líquido (-80 °C). Tras descongelarlas para iniciar un nuevo cultivo, las células deben subcultivarse al menos dos veces antes de utilizarse para evaluar los productos en cuanto a su actividad como agonista y antagonista estrogénico. Las células no se deben subcultivar a lo largo de más de treinta pases.
12. Para supervisar la estabilidad de la línea celular a lo largo del tiempo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo de agonistas y antagonistas mediante la evaluación del patrón de referencia (CE₅₀ o CI₅₀). Además, debe supervisarse la inducción relativa de la muestra de testigo positivo (TP) y la muestra de testigo negativo (TN). Los resultados deben estar de acuerdo con los criterios de aceptación para el bioensayo CELUX de agonistas (cuadro 3C) o antagonistas (cuadro 4C). Los patrones de referencia, testigos positivos y negativos, figuran en el cuadro 1 y en el cuadro 2, en relación con el modo agonista y el modo antagonista.

Condiciones de cultivo y siembra de las células

13. Las células U2OS se deben cultivar en medio de cultivo [DMEM/F12 (1 : 1) con rojo de fenol como indicador de pH, complementado con suero bovino fetal (7,5 %), aminoácidos no esenciales (1 %), 10 unidades/ml de penicilina, estreptomicina y geneticina (G-418) como marcador de selección]. Las células deben colocarse en una incubadora con CO₂ (5 % de CO₂) a 37,0 °C y 100 % de humedad. Cuando las células alcancen una confluencia del 85-95 %, deben subcultivarse o prepararse para la siembra en placas de microvaloración de 96 pocillos. En este último caso, las células se deben resuspender a la concentración de 1×10^5 células/ml en medio de ensayo libre de estrógenos [DMEM/F12 (1 : 1) sin rojo de fenol, complementado con suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano (5 % v/v), aminoácidos no esenciales (1 % v/v), 10 unidades/ml de penicilina y estreptomicina] y ponerse en los pocillos de placas de microvaloración de 96 pocillos (100 µl de suspensión homogeneizada de células). Las células deben preincubarse en una incubadora de CO₂ (5 % de CO₂, 37,0 °C, 100 % de humedad) durante 24 horas antes de la exposición. Los artículos de plástico deben estar libres de estrógenos.

Criterios de aceptabilidad

14. Se somete a ensayo el producto o productos problema en cuanto a su actividad como agonista y antagonista. Una serie de ensayo consiste en un máximo de 6 placas de microvaloración. Cada serie de ensayo contiene al menos una serie completa de diluciones de un patrón de referencia, una muestra de testigo positivo, una muestra de testigo negativo y controles del disolvente. Las figuras 1 y 2 describen la disposición de las placas para las series de pruebas de agonistas y antagonistas.

15. Debe analizarse por triplicado cada una de las diluciones de los patrones de referencia, de los productos problema, de todos los controles del disolvente, y de los testigos positivos y negativos. Cada uno de los análisis por triplicado deberá cumplir los requisitos que figuran en los cuadros 3A y 4A.
16. En la primera placa de cada serie de ensayo se mide una serie completa de diluciones del patrón de referencia (17β -estradiol para los agonistas; tamoxifeno para los antagonistas). A fin de poder comparar los resultados del análisis de las otras cinco placas de microvaloración con la primera placa de microvaloración que contiene la curva completa concentración-respuesta del patrón de referencia, todas las placas deben contener 3 muestras de control: control del disolvente, concentración más alta del patrón de referencia sometida a ensayo, y la concentración aproximada CE_{50} (agonistas) o CI_{50} (antagonistas) del patrón de referencia. La relación entre las muestras de control medias en la primera placa y las otras cinco placas debe cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).
17. Se calcula el factor z de cada una de las placas de microvaloración dentro de una serie de ensayo (10). El factor z debe calcularse utilizando las respuestas obtenidas a las concentraciones más alta y más baja del patrón de referencia. Una placa de microvaloración se considera válida en caso de que cumpla los requisitos establecidos en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).
18. El patrón de referencia debe presentar una curva dosis-respuesta sigmoidea. Los valores de CE_{50} o CI_{50} derivados de la respuesta de la serie de diluciones del patrón de referencia deben cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).
19. Cada serie de ensayo debe contener una muestra de testigo positivo y una muestra de testigo negativo. La inducción relativa calculada con la muestra de testigo tanto positivo como negativo debe cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).
20. Durante todas las mediciones, el factor de inducción de la concentración más alta del patrón de referencia debe medirse dividiendo la media de la respuesta máxima en unidades luminosas relativas (ULR) del patrón de referencia, 17β -estradiol, por la media de la respuesta en ULR del control del disolvente de referencia. Este factor de inducción debe cumplir los requisitos mínimos aplicables al factor de inducción que se indican en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).
21. Solo las placas de microvaloración que cumplan todos los criterios de aceptación antes mencionados se consideran válidas y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema.

22. Los criterios de aceptación son aplicables tanto a las tandas de precibado como a las tandas de los ensayos completos.

Cuadro 1: Concentraciones de patrón de referencia, testigo positivo (TP) y testigo negativo (TN) para el bioanálisis CALUX de agonistas

	Sustancia	N.º CAS	Intervalo de ensayo (M)
Patrón de referencia	17β-Estradiol	50-28-2	1,0 x 10 ⁻¹³ - 1,0 x 10 ⁻¹⁰
Testigo positivo (TP)	17α-Metiltestosterona	58-18-4	3,0 x 10 ⁻⁶
Testigo negativo (TN)	Corticosterona	50-22-6	1,0 x 10 ⁻⁸

Cuadro 2: Concentraciones de patrón de referencia, testigo positivo (TP) y testigo negativo (TN) para el bioanálisis CALUX de antagonistas

	Sustancia	N.º CAS	Intervalo de ensayo (M)
Patrón de referencia	Tamoxifeno	10540-29-1	3,0 x 10 ⁻⁹ - 1,0 x 10 ⁻⁵
Testigo positivo (TP)	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	1,0 x 10 ⁻⁹
Testigo negativo (TN)	Resveratrol	501-36-0	1,0 x 10 ⁻⁵

Cuadro 3: Criterios de aceptación para el bioensayo ERα CALUX de agonistas

A — Muestras individuales en una placa		Criterio
1	DT % máxima de los pocillos triplicados (de TN, TP, de cada dilución del producto problema y del patrón de referencia, excepto C0)	< 15 %
2	DT % máxima de los pocillos triplicados [del patrón de referencia y de los controles del disolvente del producto problema (C0, CD)]	< 30 %
3	Pérdida máxima de LDH como medida de la citotoxicidad	< 120 %
B — Dentro de una sola placa de microvaloración		
4	Relación entre el control del disolvente del patrón de referencia (C0; placa 1) y el control del disolvente del producto problema (CD; placas 2 a x)	0,5 a 2,0
5	Relación de las concentraciones aprox. CE ₅₀ y máxima del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones aprox. CE ₅₀ y máxima del patrón de referencia en las placas 2 a x (C4, C8)	0,70 a 1,30

6	Factor z de cada placa	> 0,6

C — Dentro de una sola serie de análisis (todas las placas de una serie)

7	Curva sigmoidea del patrón de referencia	Si (17β-estradiol)
8	Intervalo de CE ₅₀ del patrón de referencia 17β-estradiol	4 x 10 ⁻¹² - 4 x 10 ⁻¹¹ M
9	Factor mínimo de inducción de la mayor concentración de 17β-estradiol, respecto al control del disolvente del patrón de referencia	5
10	Inducción relativa (%) del TP	> 30 %
11	Inducción relativa (%) del TN	< 10 %

Aprox.: aproximado; TP: testigo positivo; TN: testigo negativo; CD: control del disolvente del producto problema; C0: control del disolvente del patrón de referencia; DT: desviación típica; LDH: lactato-deshidrogenasa.

Cuadro 4: Criterios de aceptación para el bioensayo ERα CALUX de antagonistas

A — Muestras individuales en una placa		Criterio
1	DT % máxima de los pocillos triplicados [de TN, TP, de cada dilución del producto problema y del patrón de referencia, control del disolvente (C0)]	< 15 %
2	DT % máxima de los pocillos triplicados [del control del vehículo (CVe) y de la concentración máxima del patrón de referencia (C8)]	< 30 %
3	Pérdida máxima de LDH como medida de la citotoxicidad	< 120 %
B — Dentro de una sola placa de microvaloración		
4	Relación entre el control del disolvente del patrón de referencia (C0; placa 1) y el control del disolvente del producto problema (CD; placas 2 a x)	0,70 a 1,30
5	Relación de las concentraciones aprox. CI ₅₀ del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones aprox. CI ₅₀ del patrón de referencia en las placas 2 a x (C4)	0,70 a 1,30
6	Relación de las concentraciones máximas del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones máximas del patrón de referencia en las placas 2 a x (C8)	0,50 a 2,0
7	Factor z de cada placa	> 0,6

C — Dentro de una sola serie de análisis (todas las placas de una serie)

8	Curva sigmoidea del patrón de referencia	Sí (tamoxifeno)
9	Intervalo de CI_{50} del patrón de referencia (tamoxifeno)	1×10^{-8} - 1×10^{-7} M
10	Factor mínimo de inducción del control del disolvente del patrón de referencia, con respecto a la concentración más alta de tamoxifeno	2,5
11	Inducción relativa (%) del TP	< 70 %
12	Inducción relativa (%) del TN	> 85 %

Aprox.: aproximado; TP: testigo positivo; TN: testigo negativo; C_{Ve}: control del vehículo (control del disolvente sin concentración fija del patrón de referencia de agonista); C_D: control del disolvente del producto problema; C₀: control del disolvente del patrón de referencia; DT: desviación típica; LDH: lactato-deshidrogenasa.

Control del disolvente/vehículo, patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos

23. Debe utilizarse el mismo control del disolvente/vehículo, patrones de referencia, testigos positivos y testigos negativos tanto en la tanda de precibado como en las tandas de los ensayos completos. Además, la concentración de los patrones de referencia, testigos positivos y testigos negativos debe ser la misma.

Control del disolvente

24. El disolvente que se utilice para disolver los productos problema debe someterse a ensayo como control del disolvente. El dimetilsulfóxido [DMSO, 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] se utilizó como vehículo durante la validación del bioensayo ER α CALUX. Si se utiliza un disolvente distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse con el mismo vehículo. Téngase en cuenta que el control del disolvente para los estudios de antagonistas contiene una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17 β -estradiol (CE₅₀ aproximada). Para comprobar el disolvente utilizado en los estudios de antagonistas, debe prepararse y ensayarse un control del vehículo.

Control del vehículo (antagonistas)

25. Para los estudios de antagonistas, el medio de ensayo tiene el complemento de una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17 β -estradiol (CE₅₀ aproximada). A fin de comprobar el disolvente utilizado para disolver los productos problema del estudio de antagonistas, debe prepararse un medio de ensayo sin una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17 β -estradiol. Esta muestra de control se indica como control del vehículo. El dimetilsulfóxido [DMSO, 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] se utilizó como vehículo durante la validación del bioensayo ER α CALUX. Si se utiliza un disolvente distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse con el mismo vehículo.

Patrones de referencia

26. El patrón de referencia de los agonistas es el 17 β -estradiol (cuadro 1). Los patrones de referencia comprenden una serie de diluciones de ocho concentraciones de 17 β -estradiol ($1,0 \times 10^{-13}$, $3,0 \times 10^{-13}$, $1,0 \times 10^{-12}$, $3,0 \times 10^{-12}$, $6,0 \times 10^{-12}$, $1,0 \times 10^{-11}$, $3,0 \times 10^{-11}$, $1,0 \times 10^{-10}$ M).
27. El patrón de referencia de los antagonistas es el tamoxifeno (cuadro 2). Los patrones de referencia comprenden una serie de diluciones de ocho concentraciones de tamoxifeno ($3,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $3,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ M). Cada una de las concentraciones del patrón de referencia de los antagonistas se incubó conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17 β -estradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Testigo positivo

28. El testigo positivo de los estudios de agonistas es la 17α -metiltestosterona (cuadro 1).
29. El testigo positivo de los estudios de antagonistas es el 4-hidroxitamoxifeno (cuadro 2). El testigo positivo de los antagonistas se incuba conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β -estradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Testigo negativo

30. El testigo negativo de los estudios de agonistas es la corticosterona (cuadro 1).
31. El testigo negativo de los estudios de antagonistas es el resveratrol (cuadro 2). El testigo negativo de los antagonistas se incuba conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β -estradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Demostración de la competencia del laboratorio (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA” del presente método de ensayo)

Vehículo

32. El disolvente utilizado para disolver los productos problema debe solubilizarlos completamente y ser miscible con el medio celular. Son disolventes adecuados el DMSO, el agua y el etanol (del 95 % al 100 % de pureza). En caso de que se emplee el DMSO como disolvente, su concentración máxima durante la incubación no debe superar el 1 % (v/v). Antes de su utilización, el disolvente debe someterse a ensayo para comprobar la ausencia de citotoxicidad y de interferencia con el comportamiento del ensayo.

Preparación de los patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos y productos problema

33. Se disuelven en 100 % de DMSO (o un disolvente adecuado) los patrones de referencia, los testigos positivos, los testigos negativos y los productos problema. A continuación, deben prepararse diluciones (en serie) adecuadas en el mismo disolvente. Antes de su disolución, debe permitirse que todas las sustancias se equilibren a la temperatura ambiente. Las soluciones madre recién preparadas de los patrones de referencia, los testigos positivos, los testigos negativos y los productos problema no deben tener precipitado ni turbidez apreciables. Las soluciones madre de los patrones de referencia y de los testigos pueden prepararse en gran cantidad. Las soluciones madre de los productos problema deben prepararse de nuevo antes de cada experimento. Las diluciones finales de los patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos y productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento y utilizarse en las 24 horas siguientes a la preparación.

Solubilidad, citotoxicidad y determinación del intervalo

34. Durante la tanda de precubado se determina la solubilidad de los productos problema en el disolvente elegido. Se prepara una solución madre a la concentración máxima de 0,1 M. En

caso de que esta concentración muestre problemas de solubilidad, deben prepararse soluciones madre más diluidas hasta que los productos problema estén completamente solubilizados. Durante la tanda de precibado, se someten a ensayo diluciones de producto problema en serie 1 : 10. La concentración máxima para el ensayo de agonistas o antagonistas es 1 mM. Tras realizar el precibado, se obtiene un intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para utilizarlo en las tandas de los ensayos completos. Las diluciones utilizadas para los ensayos completos deben ser de 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1 000 x y 3 000 x.

35. El ensayo de citotoxicidad está incluido en el protocolo de ensayo de agonistas y antagonistas (11). El ensayo de citotoxicidad se incorpora tanto a la tanda de precibado como a las tandas de ensayos completos. El método utilizado para evaluar la citotoxicidad durante la validación del bioensayo del ER α CALUX es la prueba de pérdida de lactato-deshidrogenasa (LDH) combinada con la inspección visual cualitativa de las células (véase el apéndice 4.1) tras la exposición a los productos problema. No obstante, pueden utilizarse otros métodos cuantitativos para la determinación de la citotoxicidad [por ejemplo, el ensayo colorimétrico con tetrazolio (MTT) o el bioensayo CALUX de citotoxicidad]. En general, las concentraciones del producto problema que muestran una reducción de más del 20 % de la viabilidad celular se consideran citotóxicas, por lo que no pueden utilizarse para la evaluación de los datos. Por lo que respecta al ensayo de pérdida de LDH, se considera que la concentración del producto problema es citotóxica cuando el porcentaje de pérdida de LDH es superior al 120 %.

Exposición al producto problema y organización de la placa del ensayo

36. Tras la tripsinización de un matraz confluyente de células cultivadas, las células se vuelven a suspender a la concentración de 1×10^5 células/ml en medio de ensayo libre de estrógenos. En los pocillos interiores de una placa de microvaloración de 96 pocillos se siembran 100 μ l de células resuspendidas. Los pocillos exteriores se llenan con 200 μ l de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) (véanse las figuras 1 y 2). Las placas se preincuban durante 24 horas en una incubadora de CO₂ (5 % de CO₂, 37,0 °C, 100 % de humedad).
37. Tras la preincubación, las placas se inspeccionan para comprobar visualmente la citotoxicidad (véase el apéndice 4.1), la contaminación y la confluencia. Solo se utilizan para el ensayo las placas que visualmente no muestren citotoxicidad ni contaminación y que presenten una confluencia del 85 % como mínimo. El medio de los pocillos interiores se retira cuidadosamente y se sustituye por 200 μ l de medio de ensayo libre de estrógenos, con diluciones en serie apropiadas de los patrones de referencia, productos problema, testigos positivos, testigos negativos y controles del disolvente (cuadro 5: estudios de agonistas; cuadro 6: estudios de antagonistas). Todos los patrones de referencia, productos problema, testigos positivos, testigos negativos y controles de los disolventes se someten a ensayo por triplicado. En la figura 1 se indica la disposición de la placa para los ensayos de agonistas. En

la figura 2 se indica la disposición de la placa para los ensayos de antagonistas. La disposición de la placa es la misma para las pruebas de precibado y para el ensayo completo. En los ensayos de antagonistas, todos los pocillos interiores, excepto los pocillos de control del vehículo (CVe), también contendrán una concentración fija del patrón de referencia agonista, el 17 β -estradiol (3,0 x 10⁻¹² M). Obsérvese que deben añadirse a cada placa de producto problema los patrones de referencia C8 y C4.

38. Tras la exposición de las células a todos los productos, las placas de microvaloración de 96 pocillos deben incubarse durante otras 24 horas en una incubadora de CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100 % de humedad).

Figura 1: Disposición de las placas de microvaloración de 96 pocillos para el precibado y la valoración del efecto agonista.

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
E		C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
F		C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
G		C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
H												

Placas siguientes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		C	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		C	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		C	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
F		C	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
G		C	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
H												

C0 = disolvente del patrón de referencia;

C(1-8) = serie de diluciones (1-8, concentración de baja a elevada) del patrón de referencia.

TP = testigo positivo;

TN = testigo negativo;

TCx-(1-8) = diluciones (1-8, concentraciones de baja a elevada) del producto problema para la tanda de precibado y para la evaluación del efecto agonista del producto problema x.

CD = control del disolvente del producto problema (idealmente, el mismo disolvente que en C0, pero puede ser de otro lote).

Casillas grises = pocillos exteriores, llenados con 200 μ l de PBS.

Figura 2: Disposición de las placas de microvaloración de 96 pocillos para el precibado de antagonistas y la valoración del efecto antagonista.

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CVe	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CVe	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CVe	
E		TN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	TP	
F		TN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	TP	
G		TN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	TP	
H												

Placas siguientes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CD	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		CD	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		CD	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
F		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
G		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
H												

C0 = disolvente del patrón de referencia;

C(1-8) = serie de diluciones (1-8, concentración de baja a elevada) del patrón de referencia.

TN = testigo negativo;

TP = testigo positivo;

TCx-(1-8) = diluciones (1-8, concentraciones de baja a elevada) del producto problema para la tanda de precribado y para la evaluación del efecto agonista del producto problema x.

CD = control del disolvente del producto problema (idealmente, el mismo disolvente que en C0, pero puede ser de otro lote).

CVe = control del vehículo (control del disolvente sin concentración fija del patrón de referencia de agonista, 17 β -estradiol).

Casillas grises = pocillos exteriores, llenados con 200 μ l de PBS.

Nota: Todos los pocillos interiores, excepto los pocillos de control del vehículo (CVe), también contendrán una concentración fija del patrón de referencia agonista, el 17 β -estradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Medición de la luminiscencia

39. La medición de la luminiscencia se describe con detalle en el protocolo del ensayo de agonistas y antagonistas (10). Debe retirarse el medio de los pocillos, y las células deben lisarse tras 24 horas de incubación, a fin de abrir la membrana celular y permitir la medición de la actividad de la luciferasa.

40. Para medir la luminiscencia, este procedimiento requiere un luminómetro equipado con dos inyectoras. La reacción de la luciferasa comienza al inyectarse el sustrato luciferina. La reacción se detiene mediante la adición de NaOH 0,2 M. La reacción se detiene para evitar que pase luminiscencia de un pocillo al otro.

41. La luz emitida de cada pocillo se expresa como unidades luminosas relativas (ULR) por pocillo.

Tanda de precibado

42. Los resultados del análisis de precibado se utilizan para determinar un intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para los ensayos completos. En el protocolo de ensayo de agonistas y antagonistas (10) se describe en profundidad la evaluación de los resultados del análisis de precibado y la determinación del intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para los ensayos completos. Aquí se ofrece un breve resumen de los procedimientos para determinar el intervalo de concentraciones de productos problema para los ensayos de agonistas y de antagonistas. Véanse en los cuadros 5 y 6 las orientaciones para el diseño de la serie de diluciones.

Selección de las concentraciones para la evaluación de los efectos agonistas

43. Durante la tanda de precibado, los productos problema deben someterse a ensayo en la serie de diluciones como se indica en los cuadros 5 (agonistas) y 6 (antagonistas). Todas las concentraciones deben ensayarse en pocillos por triplicado, siguiendo la disposición de la placa indicada en la figura 1 (agonistas) o 2 (antagonistas).
44. Solo los resultados de los análisis que cumplen los criterios de aceptación (cuadro 3) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).
45. Los intervalos iniciales de concentración de los productos problema deben ajustarse y la tanda de precibado debe repetirse en caso de que:
- se observe citotoxicidad. El procedimiento de precibado debe repetirse con concentraciones menores no citotóxicas del producto problema.
 - el precibado del producto problema no muestre una curva completa de dosis-respuesta, porque las concentraciones ensayadas generan la inducción máxima. La tanda de precibado debe repetirse con concentraciones menores del producto problema.
46. Cuando se observe una respuesta válida relacionada con la dosis, se debe seleccionar la concentración (más baja) a la que se haya observado la inducción máxima sin presencia de citotoxicidad. La concentración máxima del producto problema que se va a someter a las tandas del ensayo completo debe ser 3 veces esta concentración seleccionada.

47. Debe prepararse una serie completa de diluciones afinadas del producto problema con las fases de dilución indicadas en el cuadro 5, empezando por la mayor concentración anteriormente determinada.
48. Los productos problema que no provoquen ningún efecto agonista deben someterse a ensayo en las tandas completas empezando por la mayor concentración no citotóxica que se haya identificado durante el precibado.

Selección de las concentraciones para la evaluación de los efectos antagonistas

49. Solo los resultados de los análisis que cumplen los criterios de aceptación (cuadro 4) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).
50. Los intervalos iniciales de concentración de los productos problema deben ajustarse y la tanda de precibado debe repetirse en caso de que:
 - se observe citotoxicidad. El procedimiento de precibado debe repetirse con concentraciones menores no citotóxicas del producto problema.
 - el precibado del producto problema no muestre una curva completa de dosis-respuesta, porque las concentraciones ensayadas generan la inhibición máxima. El precibado debe repetirse con concentraciones menores del producto problema.
51. Cuando se encuentre una respuesta válida relacionada con la dosis, se debe seleccionar la concentración (más baja) a la que se haya observado la inhibición máxima sin presencia de citotoxicidad. La concentración máxima del producto problema que se va a someter a las tandas del ensayo completo debe ser 3 veces esta concentración seleccionada.
52. Debe prepararse una serie completa de diluciones afinadas del producto problema con las fases de dilución indicadas en el cuadro 6, empezando por la mayor concentración anteriormente determinada.
53. Los productos problema que no provoquen ningún efecto antagonista deben someterse a ensayo en las tandas completas empezando por la mayor concentración no citotóxica que se haya identificado durante el precibado.

Tandas completas

54. Tras la selección de los intervalos afinados de concentraciones, los productos problema deben someterse al ensayo completo en la serie de diluciones que se indica en los cuadros 5

(agonistas) y 6 (antagonistas). Todas las concentraciones deben ensayarse en pocillos por triplicado, siguiendo la disposición de la placa indicada en la figura 1 (agonistas) o 2 (antagonistas).

55. Solo los resultados de los análisis que cumplan los criterios de aceptación (cuadros 3 y 4) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).

Cuadro 5: Concentración y diluciones de los patrones de referencia, testigos y productos problema utilizados para los ensayos de agonistas

Concentración (M) del 17β-estradiol de referencia		Dilución del TCx en la tanda de precibado		Dilución del TCx en el ensayo completo		Concentración (M) de los testigos	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	3,0 x 10 ⁻⁶
C1	1,0 x 10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	1,0 x 10 ⁻⁸
C2	3,0 x 10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0 x 10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	CD	0
C4	3,0 x 10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0 x 10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0 x 10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0 x 10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0 x 10 ⁻¹⁰						

TCx: producto problema x.

TP: testigo positivo (17α-metiltestosterona).

TN: testigo negativo (corticosterona).

C0: control del disolvente del patrón de referencia.

CD: control del disolvente del producto problema.

Cuadro 6: Concentración y diluciones de los patrones de referencia, testigos y productos problema utilizados para los ensayos de antagonistas

Concentración (M) del tamoxifeno de referencia		Dilución del TCx en la tanda de precibado		Dilución del TCx en el ensayo completo		Concentración (M) de los testigos	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	1,0 x 10 ⁻⁹
C1	3,0 x 10 ⁻⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	1,0 x 10 ⁻⁵
C2	1,0 x 10 ⁻⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0

C3	$3,0 \times 10^{-08}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	CD	0
C4	$1,0 \times 10^{-07}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Concentración (M) del agonista complementado	
C5	$3,0 \times 10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 \times 10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \times 10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β -Estradiol	$3,0 \times 10^{-12}$
C8	$1,0 \times 10^{-05}$						

TCx: producto problema x.

TP: testigo positivo (4-hidroxitamoxifeno).

TN: testigo negativo (resveratrol).

C0: control del disolvente del patrón de referencia.

CD: control del disolvente del producto problema.

CVe: control del vehículo (no contiene una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17 β -estradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M)).

Recogida y análisis de los datos

56. Tras las tandas de precibado y del ensayo completo, en el ensayo de agonistas deben determinarse los valores de CE_{10} , CE_{50} , CP_{10} , CP_{50} e inducción máxima ($TCx_{m\acute{a}x}$) de un producto problema. En el ensayo de antagonistas deben calcularse los valores de CI_{20} , CI_{50} , CP_{80} , CP_{50} e inducción mínima ($TCx_{m\acute{i}n}$). En las figuras 3 (agonistas) y 4 (antagonistas), se ofrece una representación gráfica de estos parámetros. Los parámetros requeridos se calculan sobre la base de la inducción relativa de cada producto problema [respecto a la inducción máxima del patrón de referencia (= 100 %)]. Para la evaluación de los datos, debe utilizarse una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros) con arreglo a la ecuación siguiente:

$$Y = Valor inferior + \frac{(Valor superior - Valor inferior)}{(1 + 10^{((\lg CE_{50} - X) * pendiente de Hill)})}$$

donde:

X = log. de la dosis o de la concentración

Y = respuesta [inducción relativa (%)]

Valor superior = inducción máxima (%)

Valor inferior = inducción mínima (%)

Log CE_{50} = log. de la concentración a la que se observa el 50 % de la respuesta máxima

Pendiente de Hill = factor de pendiente de la pendiente de Hill.

57. Los datos brutos del luminómetro, expresados como unidades luminosas relativas (ULR), deben transferirse a la hoja de cálculo del análisis de los datos diseñada para las tandas de precibado y de ensayo completo. Los datos brutos deben cumplir los criterios de aceptación que se indican en los cuadros 3A y 3B (agonistas) o 4A y 4B (antagonistas). En el caso de

que los datos brutos cumplan los criterios de aceptación, se efectuarán las siguientes etapas de cálculo para determinar los parámetros requeridos:

Agonistas

- Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los patrones de referencia, el valor medio de ULR del control del disolvente del patrón de referencia.
- Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los productos problema, el valor medio de ULR del control del disolvente del producto problema.
- Calcular la inducción relativa de cada concentración del patrón de referencia. Fijar en el 100 % la inducción de la concentración máxima del patrón de referencia.
- Calcular la inducción relativa de cada concentración de producto problema en comparación con la concentración máxima del patrón de referencia, que es el 100 %.
- Evaluar los resultados del análisis tras una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros).
- Determinar los valores CE_{50} y CE_{10} del patrón de referencia.
- Determinar los valores CE_{50} y CE_{10} de los productos problema.
- Determinar la inducción relativa máxima del producto problema ($TC_{m\acute{a}x}$).
- Determinar los valores de CP_{10} y CP_{50} de los productos problema.

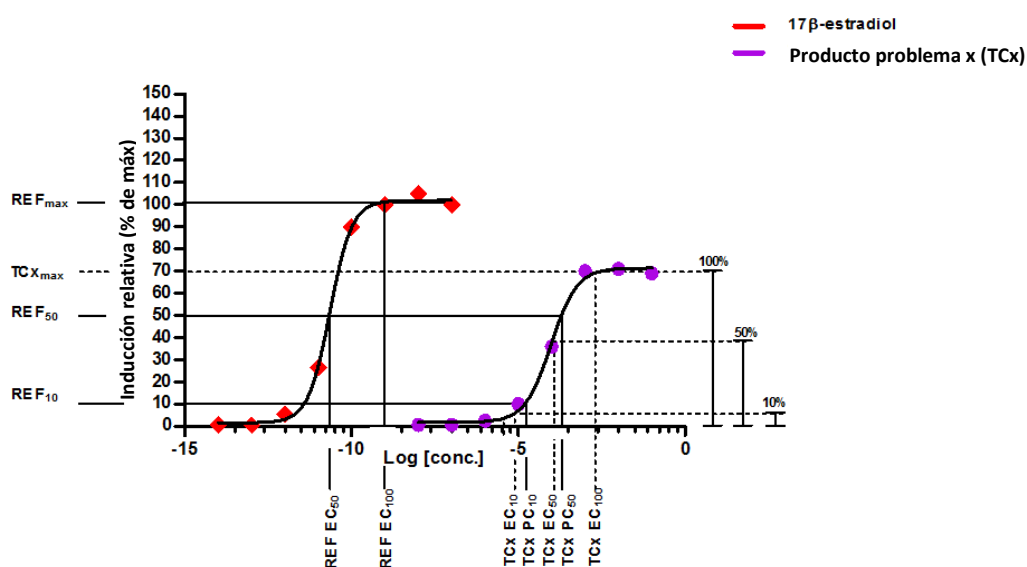
En relación con los productos problema, puede que no siempre se consiga una curva dosis-respuesta completa debido, por ejemplo, a problemas de citotoxicidad o de solubilidad. Por tanto, no es posible determinar los valores CE_{50} , CE_{10} y TP_{50} . En tal caso, solo pueden determinarse los valores de CP_{10} y $TC_{m\acute{a}x}$.

Antagonistas

- Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los patrones de referencia, el valor medio de ULR de la mayor concentración del patrón de referencia.
- Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los productos problema, el valor medio de ULR de la mayor concentración del patrón de referencia.
- Calcular la inducción relativa de cada concentración del patrón de referencia. Fijar en el 100 % la inducción de la concentración mínima del patrón de referencia.
- Calcular la inducción relativa de cada concentración de producto problema en comparación con la concentración mínima del patrón de referencia, que es el 100 %.
- Evaluar los resultados del análisis tras una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros).
- Determinar los valores de CI_{50} y CI_{20} del patrón de referencia.

- Determinar los valores de CI_{50} y CI_{20} de los productos problema.
- Determinar la inducción relativa mínima del producto problema ($TC_{\min}$).
- Determinar los valores de CP_{80} y CP_{50} de los productos problema.

Figura 3: Visión general de los parámetros determinados en el ensayo de agonistas



CE_{10} = concentración de una sustancia a la que se observa el 10 % de su respuesta máxima.

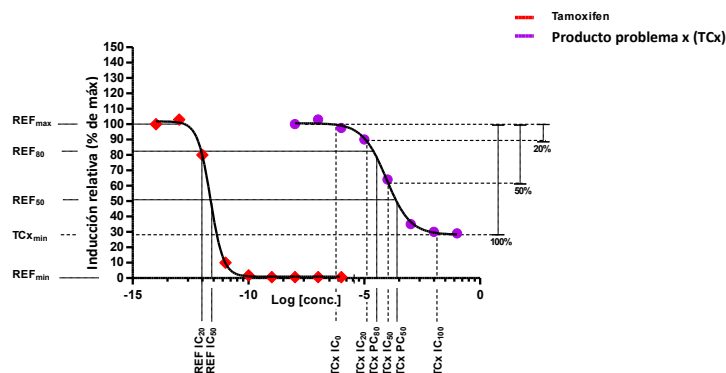
CE_{50} = concentración de una sustancia a la que se observa el 50 % de su respuesta máxima.

CP_{10} = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la CE_{10} del patrón de referencia.

CP_{50} = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la CE_{50} del patrón de referencia.

$TCx_{\max}$ = inducción relativa máxima del producto problema.

Figura 4: Visión general de los parámetros determinados en el ensayo de antagonistas



CI_{20} = concentración de una sustancia a la que se observa el 80 % de su respuesta máxima (20 % de inhibición).

CI_{50} = concentración de una sustancia a la que se observa el 50 % de su respuesta máxima (50 % de inhibición).

TP_{80} = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la CI_{20} del patrón de referencia.

TP_{50} = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la CI_{50} del patrón de referencia.

$TC_{x\min}$ = inducción relativa mínima del producto problema.

En relación con los productos problema, puede que no siempre se consiga una curva dosis-respuesta completa debido, por ejemplo, a problemas de citotoxicidad o de solubilidad. Por tanto, no es posible determinar los valores CI_{50} , CI_{20} y TP_{50} . En tal caso, solo pueden determinarse los valores TP_{20} y $TC_{\min}$.

58. Los resultados deben basarse en dos (o tres) tandas independientes. Si dos tandas dan resultados comparables y, por lo tanto, reproducibles, no es necesario realizar una tercera tanda. Para ser aceptables, los resultados deben:

- cumplir los criterios de aceptabilidad (véanse los criterios de aceptabilidad, puntos 14-22),
- ser reproducibles.

Criterios de interpretación de los datos

59. Para interpretar los datos y tomar la decisión de si un producto problema se considera positivo o negativo, deben utilizarse los criterios siguientes:

Agonistas

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **positivo** cuando:

1. El valor de $TC_{\max}$ es igual o superior al 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia (REF_{10}).
2. Al menos dos concentraciones consecutivas del producto problema son iguales o superiores a REF_{10} .

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **negativo** cuando:

1. El valor de $TC_{\max}$ no supera el 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia (REF_{10}).
2. Son iguales o superiores a REF_{10} menos de dos concentraciones del producto problema.

Antagonistas

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **positivo** cuando:

1. El valor de $TC_{\min}$ es igual o inferior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{80} = 20$ % de inhibición).
2. Al menos dos concentraciones consecutivas del producto problema son iguales o inferiores a REF_{80} .

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **negativo** cuando:

1. El valor de $TC_{\min}$ es superior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{80} = 20$ % de inhibición).
 2. Son iguales o inferiores a REF_{80} menos de dos concentraciones del producto problema.
60. Para caracterizar la potencia de la respuesta positiva de un producto problema, deben indicarse la magnitud del efecto (agonistas: $TC_{\max}$; antagonistas: $TC_{\min}$) y la concentración a la que se produce el efecto (agonistas: CE_{10} , CE_{50} , CP_{10} , CP_{50} ; antagonistas: CI_{20} , CI_{50} , TP_{80} , TP_{50}).

INFORME DEL ENSAYO

61. Véase el punto 20 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA”.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of

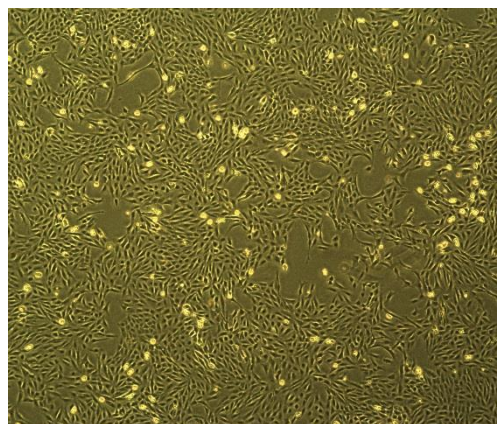
polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
- (11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Paises Bajos.

Apéndice 4.1: Inspección visual de la viabilidad celular

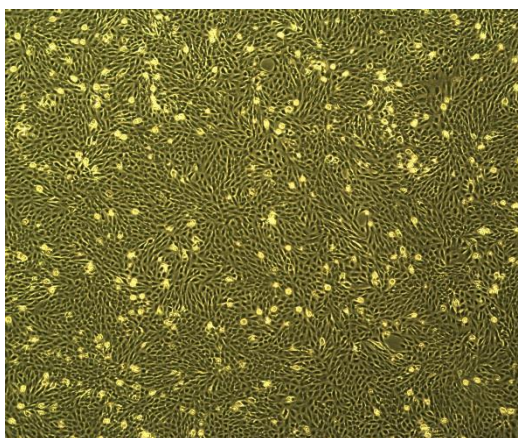


Confluencia < 5 %. Se acaban de sembrar las células. Viabilidad celular del 100 %. Clasificación: “sin citotoxicidad”.



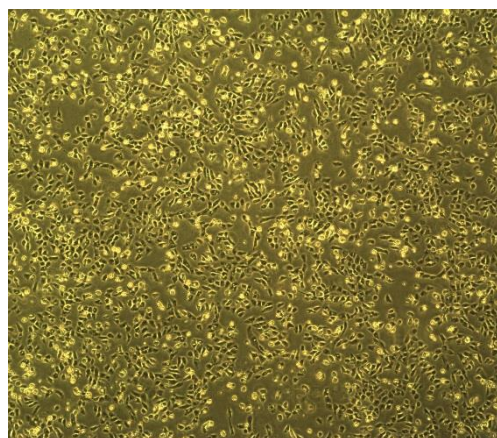
Confluencia > 85 %. En esta fase, las células se exponen a los productos problema. Viabilidad celular > 95 %.

Clasificación: “sin citotoxicidad”.

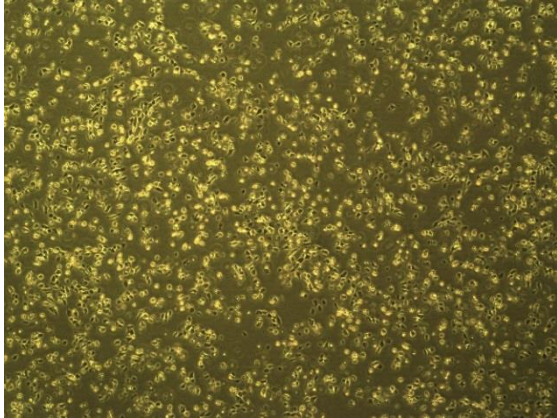


Confluencia > 95 %. Las células están densamente empaquetadas y empiezan a crecer en exceso. Viabilidad celular > 95 %.

Clasificación: “sin citotoxicidad”.



Viabilidad celular < 25 %. Las células se separan y disminuye el contacto entre ellas. Las células están redondeadas. Clasificación: “citotoxicidad”.



Viabilidad celular $< 5\%$. Las células están totalmente separadas y está interrumpido el contacto entre ellas. Las células están redondeadas. Clasificación: "citotoxicidad".

B.67. ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO EL GEN DE LA TIMIDINA-CINASA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 490 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se examinan y se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y el bienestar animal. El ensayo con células de linfoma de ratón (MLA) y el ensayo con células TK6 utilizando el locus de la timidina-cinasa (TC) estaban originalmente incluidos en el método de ensayo B.17. Posteriormente, el grupo de trabajo de expertos MLA del Taller Internacional sobre Ensayos de Genotoxicidad (International Workshop for Genotoxicity Testing, IWGT) ha elaborado recomendaciones internacionalmente armonizadas en relación con los criterios de aceptación del ensayo y la interpretación de los datos respecto al ensayo MLA (1) (2) (3) (4) (5), y estas recomendaciones se incorporan en el presente y nuevo método de ensayo B.67. Este método de ensayo está escrito para el ensayo MLA y, dado que también utiliza el locus TK, para el ensayo TK6. Mientras que el MLA se ha utilizado ampliamente con fines normativos, el TK6 se ha utilizado mucho menos a menudo. Hay que señalar que, a pesar de la similitud entre los parámetros, las dos líneas celulares no son intercambiables y los programas normativos pueden expresar válidamente una preferencia por uno sobre el otro con vistas a un uso normativo particular. Por ejemplo, la validación del punto MLA demostró su adecuación para detectar no solo la mutación génica, sino también la capacidad de un producto problema para inducir una lesión cromosómica estructural. El presente método forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (6).
2. El objetivo de los ensayos de mutación génica con células de mamífero *in vitro* es detectar las mutaciones génicas inducidas por los productos. Las líneas celulares utilizadas en estos ensayos miden las mutaciones directas en genes marcadores y, en concreto, en el gen endógeno de la timidina-cinasa (TK en el caso de las células humanas y *Tk* en el caso de las células de roedores, denominadas conjuntamente *TK* en el presente método de ensayo). Este método de ensayo está diseñado para su uso con dos líneas celulares: la línea celular de linfoma de ratón L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C (generalmente denominada L5178Y) y la línea celular linfoblastoide humana TK6 (generalmente denominada TK6). Aunque las dos líneas celulares varían debido a su origen, crecimiento celular, situación de p53, etc., los ensayos de mutación génica *TK* pueden realizarse de forma similar con ambos tipos de células, tal como se describe en el presente método de ensayo.

3. La naturaleza autosómica y heterocigótica del gen de la timidina-cinasa permite detectar las colonias viables cuyas células sean deficientes en la enzima timidina-cinasa tras la mutación de $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$. Esta deficiencia puede deberse a fenómenos genéticos que afecten al gen TK , incluidas las mutaciones génicas (mutaciones puntuales, mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, pequeñas supresiones, etc.) y los fenómenos cromosómicos (supresiones grandes, reorganizaciones cromosómicas y recombinación mitótica). Estos últimos fenómenos se expresan como pérdida de heterocigosis, que es un cambio genético común de los genes supresores de tumores en la oncogénesis humana. En teoría, con el MLA puede detectarse la pérdida de todo el cromosoma portador del gen TK que resulta de la alteración del huso o de la ausencia de disyunción mitótica. De hecho, una combinación de análisis citogenético y molecular muestra claramente que algunos mutantes TK según el MLA son el resultado de una ausencia de disyunción. Sin embargo, la ponderación de las pruebas muestra que los ensayos de mutación del gen TK no pueden detectar con fiabilidad los anéugenos cuando se aplican los criterios de citotoxicidad normales (tal como se describen en el presente método de ensayo) y, por tanto, no es adecuado utilizar estos ensayos para detectar anéugenos (7) (8) (9).
4. En las pruebas de mutación del gen TK , se generan dos clases fenotípicas distintas de mutantes TK ; los mutantes de crecimiento normal, que crecen al mismo ritmo que las células heterocigóticas TK , y los mutantes de crecimiento lento, que crecen con tiempos de generación prolongados. Los mutantes de crecimiento normal y de crecimiento lento se reconocen como mutantes de colonias grandes y de colonias pequeñas en el análisis MLA y como mutantes de colonias de aparición temprana y de aparición tardía en el ensayo $TK6$. Debe estudiarse detenidamente la naturaleza molecular y citogenética de los mutantes MLA tanto de colonias grandes como de colonias pequeñas (8) (10) (11) (12) (13). También debe estudiarse a fondo la naturaleza molecular y citogenética de los mutantes $TK6$ tanto de aparición temprana como de aparición tardía (14) (15) (16) (17). Los mutantes de crecimiento lento de ambos tipos de células han sufrido lesiones genéticas que afectan al posible gen o genes de regulación del crecimiento cerca del locus TK , lo que da lugar a tiempos de generación prolongados y a la formación de colonias pequeñas o de aparición tardía (18). La inducción de mutantes de crecimiento lento se ha asociado con productos que inducen cambios estructurales macroscópicos a nivel cromosómico. Las células cuyas lesiones no afectan al posible gen o genes de regulación del crecimiento cerca del locus TK crecen a ritmos similares a los de las células parentales y se convierten en mutantes de crecimiento normal. La inducción de mutantes de crecimiento básicamente normal se asocia con productos que actúan fundamentalmente como mutágenos puntuales. Por consiguiente, es esencial recontar tanto los mutantes de crecimiento lento como los mutantes de crecimiento normal, a fin de aislar todos los

mutantes y hacerse una idea del tipo o tipos de lesiones (mutágenos frente a clastógenos) inducidas por el producto problema (10) (12) (18) (19).

5. El método de ensayo se organiza de manera que proporcione información general aplicable tanto al ensayo MLA como al TK6, así como orientaciones especializadas para los distintos ensayos.
6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Los ensayos efectuados *in vitro* requieren generalmente el uso de una fuente exógena de activación metabólica. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*.
8. Hay que procurar evitar las condiciones que puedan llevar a la producción de resultados positivos que sean artefactos (es decir, debidos a la posible interacción con el sistema de ensayo), no causados por la interacción entre el producto problema y el material genético de la célula; pueden mencionarse entre tales condiciones los cambios de pH o de osmolalidad, la interacción con los componentes del medio (20) (21), o unos niveles excesivos de citotoxicidad (22) (23) (24). Se considera excesiva para el ensayo MLA y el TK6 la citotoxicidad que supere los niveles máximos recomendados de citotoxicidad que se definen en el punto 28. Además, debe tenerse en cuenta que los productos problema que sean análogos de la timidina, o se comporten como tales, pueden aumentar la frecuencia de la aparición de mutantes mediante un crecimiento selectivo de los mutantes espontáneos de fondo durante el tratamiento celular y exigir métodos de ensayo adicionales para una evaluación adecuada (25).
9. En caso de nanomateriales fabricados, puede ser necesario recurrir a adaptaciones específicas del presente método de ensayo, pero estas no se describen aquí.
10. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.
11. Las células mutantes deficientes en actividad enzimática de timidina-cinasa a causa de una mutación $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$ son resistentes a los efectos citostáticos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidina-cinasa son sensibles a la TFT, lo que inhibe el metabolismo celular y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en

presencia de TFT y forman colonias visibles, al contrario que las células que contienen la enzima TK.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. Se exponen al producto problema células en suspensión, tanto en presencia como en ausencia de una fuente exógena de activación metabólica (véase el punto 19), durante un plazo adecuado (véase el punto 33), y después se subcultivan para determinar la citotoxicidad y permitir la expresión fenotípica antes de la selección de los mutantes. La citotoxicidad se determina mediante el crecimiento relativo total (CRT, véase el punto 25) en el MLA y mediante la supervivencia relativa (SR, véase el punto 26) en el TK6. Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un período de tiempo suficiente y específico para cada tipo celular (véase el punto 37), de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima. Tras la expresión fenotípica, la frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con el agente selectivo para detectar las colonias de mutantes, y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficiencia de clonación (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. La frecuencia de mutantes se calcula en función del número de colonias de mutantes, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación, en el momento de la selección de los mutantes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparaciones

Células

13. En cuanto al ensayo MLA: Dado que el ensayo MLA se ha desarrollado y caracterizado a partir de la sublínea $TK^{+/-}$ -3.7.2C de las células L5178Y, esta es la sublínea específica que debe utilizarse en el ensayo MLA. La línea celular L5178Y se ha obtenido a partir de un linfoma de timo inducido con metilcolantreno en un ratón DBA-2 (26). Clive y colaboradores trataron células L5178Y (designadas por Clive como $TK^{+/+}$ -3) con sulfonato de etilmetano y aislaron un clon $TK^{-/-}$ (designado como $TK^{-/-}$ -3.7) utilizando bromodesoxiuridina como agente selectivo. A partir del clon $TK^{-/-}$ se aislaron un clon $TK^{+/-}$ espontáneo (designado como $TK^{+/-}$ -3.7.2.) y un subclón (designado como $TK^{+/-}$ -3.7.2), que se caracterizaron para utilizarse en el ensayo MLA (27). Se ha publicado el cariotipo de la línea celular (28) (29) (30) (31). El número modal de cromosomas es 40. Hay un cromosoma metacéntrico (t12;13) que debe contarse como un solo cromosoma. El locus *TK* del ratón se encuentra en el extremo distal del cromosoma 11. La línea celular L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C tiene mutaciones en los dos alelos p53 y produce proteína p53 mutante (32) (33). Es

probable que la situación de la línea celular TK^{+/-}-3.7.2C en cuanto a la proteína p53 sea responsable de la capacidad del ensayo para detectar lesiones a gran escala (17).

14. En cuanto al ensayo TK6: TK6 es una línea celular linfoblastoide humana. La línea celular original es una línea celular transformada con virus de Epstein-Barr, WI-L2, que inicialmente se obtuvo de un varón de 5 años con esferocitosis hereditaria. El primer clon aislado, el HH4, fue sometido a tratamiento mutagénico con CIR191 y se generó una línea celular TK heterocigótica, la TK6 (34). Las células TK6 son casi diploides y el cariotipo representativo es 47, XY, 13 +, t(14; 20), t(3; 21) (35). El locus TK del hombre se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17. La línea celular TK6 es competente respecto a p53 porque tiene una secuencia p53 de tipo natural en ambos alelos y expresa únicamente la proteína p53 de tipo natural (36).
15. Tanto en el ensayo MLA como en el TK6, cuando se establezca por primera vez o se reponga un cultivo madre, es aconsejable que el laboratorio de ensayo garantice la ausencia de contaminación por *Mycoplasma*, establezca el cariotipo de las células o marque los cromosomas que albergan el locus TK, y compruebe los tiempos de duplicación de la población. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal de las células utilizadas en el laboratorio de ensayo, la cual debe ser coherente con las características celulares publicadas (16) (19) (37). Este cultivo madre debe conservarse a una temperatura igual o inferior a -150 °C y utilizarse para preparar todos los cultivos celulares de trabajo.
16. Antes de establecer un gran número de cultivos de trabajo crioconservados o justo antes de su utilización en un experimento, puede ser necesario suprimir de los cultivos las células mutantes preexistentes [a menos que la frecuencia de los mutantes (FM) del control del disolvente esté ya dentro del intervalo aceptable (véase el cuadro 2 en relación con el MLA)]. Esto se consigue utilizando metotrexato (aminopterina) para excluir las células deficientes en cuanto al TK y añadiendo timidina, hipoxantina y glicina (L5178Y) o 2'-desoxicitidina (TK6) al cultivo para garantizar un crecimiento óptimo de las células competentes en cuanto al TK (19) (38) (39), y (40) respecto a las células TK6. En las referencias (19) (31) (37) (39) (41) se ofrece asesoramiento general sobre buenas prácticas para el mantenimiento de los cultivos celulares, así como asesoramiento específico sobre las células L5178Y y TK6. Para los laboratorios que necesiten cultivos celulares madre para iniciar el ensayo MLA o el TK6, o bien para obtener nuevos cultivos celulares madre, se dispone de un depósito celular de células bien caracterizadas (37).

Medios y condiciones de cultivo

17. En ambos ensayos, para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (es decir, recipientes de cultivo, atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, y temperatura de incubación de 37 °C). Los

cultivos celulares deben mantenerse siempre en condiciones que garanticen que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Es especialmente importante elegir medios y condiciones de cultivo que garanticen un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y clonación de las células, tanto mutantes como no mutantes. En los ensayos MLA y TK6, también es importante que las condiciones de cultivo aseguren un crecimiento óptimo de los mutantes TK tanto de colonias grandes / aparición temprana como de colonias pequeñas / aparición tardía. En (19) (31) (38) (39) (40) (42) se pueden encontrar más precisiones sobre los cultivos, incluida la necesidad de calentar convenientemente el suero de caballo para inactivarlo, si se utiliza el medio RPMI durante la selección de mutantes.

Preparación de los cultivos

18. Las células se propagan a partir de cultivos madre, y se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que los cultivos en suspensión sigan creciendo exponencialmente a lo largo de los períodos de tratamiento y de expresión.

Activación metabólica

19. Se debe recurrir a sistemas exógenos de metabolización cuando se utilicen células L5178Y y TK6 porque su capacidad metabólica endógena es inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo en casos justificados, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (43) (44) (45) o una combinación de fenobarbital y β -naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (52), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (45) (46) (47) (48) (49). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 %, pero que pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de los productos problema.

Preparación del producto problema

20. Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células (véase el punto 21). Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (53) (54) (55). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

CONDICIONES DE ENSAYO

Disolventes

21. El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad del producto problema sin tener un impacto negativo en la realización del ensayo, por ejemplo por cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo, o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son disolventes bien establecidos el agua o el dimetilsulfóxido. En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v) y los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben superar el 10 % (v/v) en el medio de tratamiento final. Si se utilizan disolventes distintos de los que están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y los productos problema, y su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante utilizar testigos sin tratar (véanse las definiciones en el apéndice 1) para demostrar que el disolvente elegido no es nocivo ni induce efectos mutagénicos.

MEDICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO

22. Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas que sean artefactos, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 28), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 29), o cambios marcados del pH o de la osmolalidad (véase el punto 8). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos que sean artefactos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.
23. La selección de las concentraciones se basa en la citotoxicidad y en otras consideraciones (véanse los puntos 27-30). Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar ese ensayo inicial. Incluso aunque se realice una evaluación inicial de la citotoxicidad, sigue siendo necesario medir la citotoxicidad en cada cultivo del experimento principal. Si se lleva a cabo un experimento de determinación del intervalo, debe abarcar un amplio intervalo de concentraciones y puede finalizarse el día 1 después del tratamiento o prolongarse durante los dos días de la expresión y hasta la selección de mutantes (si se ve que las concentraciones utilizadas son las adecuadas).

24. La citotoxicidad se debe determinar en relación con cada cultivo de ensayo y con cada cultivo testigo: los métodos del ensayo MLA (2) y del TK6 (15) están definidos por prácticas acordadas a nivel internacional.
25. En relación con las versiones del MLA tanto en agar como en micropocillos: la citotoxicidad debe evaluarse utilizando el crecimiento relativo total (CRT), definido originalmente por Clive y Spector en 1975 (2). Esta medida incluye el crecimiento relativo en la suspensión (CRS: cultivo de ensayo frente al control del disolvente) durante el tratamiento celular, el tiempo de expresión y la eficacia relativa de clonación (ERC: cultivo de ensayo frente al control del disolvente) en el momento en que se seleccionan los mutantes (2). Cabe señalar que el CRS incluye cualquier pérdida de células que se produzca en el cultivo de ensayo durante el tratamiento (véanse las fórmulas en el apéndice 2).
26. En cuanto al ensayo TK6: la citotoxicidad debe evaluarse utilizando la supervivencia relativa (SR), es decir, la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta las eventuales pérdidas de células durante el tratamiento, sobre la base del recuento celular, frente a la del testigo negativo (al que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase la fórmula en el apéndice 2).
27. Deben evaluarse al menos cuatro concentraciones de ensayo (sin incluir el testigo positivo ni el control del disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Si bien es aconsejable utilizar cultivos duplicados, a cada concentración estudiada podrán utilizarse cultivos tratados bien replicados o bien únicos. Los resultados obtenidos en los cultivos replicados a una concentración determinada deben comunicarse por separado, pero pueden agruparse para el análisis de datos (55). En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Cuando se produce citotoxicidad, deben seleccionarse las concentraciones de ensayo para cubrir el intervalo de citotoxicidad a partir de la concentración que provoca citotoxicidad según se describe en el punto 28, con inclusión en particular de las concentraciones a las que existe citotoxicidad moderada y débil o nula. Muchos productos problema presentan curvas concentración-respuesta de elevada pendiente y, a fin de abarcar toda la gama de citotoxicidad o de estudiar la relación concentración-respuesta en detalle, puede ser necesario utilizar concentraciones más próximas entre sí y en un número superior a cuatro, en particular en situaciones en las que se requiera repetir un experimento (véase el punto 70). La utilización de más de cuatro concentraciones puede ser especialmente importante si se utilizan cultivos únicos.

28. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más alta debe aspirar a proporcionar entre el 20 y el 10 % de CRT en el caso del MGA, y entre el 20 y el 10 % de SR en el caso del TK6 (punto 67).
29. Con productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima del límite de solubilidad, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos falsos. Dado que los ensayos MLA y TK6 utilizan cultivos en suspensión, hay que tener especial cuidado para que el precipitado no interfiera con la realización del ensayo. Puede ser útil también determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de efectuar el experimento.
30. Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (57) (58). Cuando el producto problema no tenga una composición definida y se trate, p. ej., de una sustancia de composición desconocida o variable, de productos complejos de reacción o de materiales biológicos [es decir, sustancias de composición desconocida o variable (UVCB)], extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (p. ej., 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (59).

Testigos

31. Se deben incluir, con cada condición experimental, testigos negativos en paralelo (véase el punto 21), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y manipulados de la misma manera que los cultivos tratados.
32. Es necesario disponer de testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar mutágenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado, la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica (si procede), y la detección adecuada de los mutantes *TK* tanto grandes / de aparición temprana como pequeños / de aparición tardía. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otras sustancias, si se justifica. Debido a que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados respecto a los tratamientos a corto plazo (3-4 horas) realizados en paralelo, con y sin activación metabólica, utilizando la misma duración del tratamiento, el uso de testigos positivos puede limitarse a un mutágeno que requiera

activación metabólica. En este caso, una respuesta de este único testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la sensibilidad del sistema de ensayo. Si se utilizan, los tratamientos a largo plazo (es decir, 24 horas sin fracción S9) deben tener, no obstante, su propio testigo positivo, ya que la duración del tratamiento será diferente de la del ensayo con activación metabólica. Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que se espere que den un aumento reproducible y detectable respecto al nivel de fondo, a fin de demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo, y la respuesta no debe ponerse en peligro por una citotoxicidad que supere los límites especificados en el presente método de ensayo (véase el punto 28).

Cuadro 1: Sustancias de referencia recomendadas para evaluar la competencia del laboratorio, y para la selección de los testigos positivos

Categoría	Sustancia	N.º CAS
1. Mutágenos activos sin activación metabólica		
Metanosulfonato de metilo	66-27-3	
Mitomicina C	50-07-7	
N-Óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5	
2. Mutágenos que necesitan activación metabólica		
Benzo(a)pireno	50-32-8	
Ciclofosfamida (monohidrato)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-Dimetilbenzoantraceno	57-97-6	
3-Metilcolantreno	56-49-5	

PROCEDIMIENTO

Tratamiento con el producto problema

33. Se tratan células en crecimiento con el producto problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La exposición debe durar un plazo de tiempo adecuado (generalmente de 3 a 4 horas). Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (59). En relación con el ensayo MLA, en los casos en que el tratamiento a corto plazo dé resultados negativos, y se disponga de información que sugiera la necesidad de un tratamiento más prolongado [por ejemplo, análogos de nucleósidos, productos poco solubles (5) (59)], debe prestarse atención a la realización del ensayo con un tratamiento más largo, es decir, 24 horas sin S9.

34. El número mínimo de células utilizadas para cada cultivo del ensayo (testigo y tratado) en cada fase del ensayo debe basarse en la frecuencia de mutantes espontáneos. Una orientación general consiste en tratar y resembrar suficientes células de cada cultivo experimental de forma que se mantengan al menos 10 mutaciones espontáneas, aunque lo ideal es que sean 100, en todas las fases del ensayo (tratamiento, expresión fenotípica y selección de mutantes) (56).
35. Para el ensayo MLA, la frecuencia de mutantes espontáneos aceptable recomendada se sitúa entre $35 \text{ y } 140 \times 10^{-6}$ (versión en agar) y entre $50 \text{ y } 170 \times 10^{-6}$ (versión en micropocillos) (véase el cuadro 2). Para tener como mínimo 10, e idealmente 100, mutantes espontáneos que sobrevivan al tratamiento en cada cultivo de ensayo, es necesario tratar al menos 6×10^6 células. El tratamiento de este número de células, y el mantenimiento de células suficientes durante la expresión y la clonación para la selección de mutantes, proporciona un número suficiente de mutantes espontáneos (10 o más) en todas las fases del experimento, incluso en el caso de los cultivos tratados con concentraciones que dan lugar a una citotoxicidad del 90 % (medida por un CRT del 10 %) (19) (38) (39).
36. En el caso del ensayo TK6, la frecuencia de mutantes espontáneos suele estar entre 2 y 10×10^{-6} . Para tener como mínimo 10 mutantes espontáneos que sobrevivan al tratamiento en cada cultivo, es necesario tratar al menos 20×10^6 células. El tratamiento de este número de células ofrece un número suficiente de mutaciones espontáneas (10 o más), incluso en el caso de los cultivos tratados con concentraciones que provocan una citotoxicidad del 90 % durante el tratamiento (10 % de SR). Además, ha de disponerse de un número suficiente de células para cultivarlas durante el período de expresión y para sembrarlas a efectos de la selección de mutantes (60).

Período de expresión fenotípica y medición de la citotoxicidad y de la frecuencia de mutantes

37. Al final del período de tratamiento, las células se cultivan durante un tiempo determinado para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes recién inducidos; este tiempo es específico de cada línea celular. En el ensayo MLA, el período de expresión fenotípica es de 2 días. En el ensayo TK6, el período de expresión fenotípica es de 3-4 días. Si se utiliza un tratamiento de 24 horas, el período de expresión comienza una vez finalizado el tratamiento.
38. Durante el período de expresión fenotípica, las células se enumeran diariamente. En el caso del MLA se utilizan los recuentos celulares diarios para calcular el crecimiento diario en la suspensión (CS). Tras el período de expresión de 2 días, las células se suspenden en medio con y sin agente selectivo para determinar el número de mutantes (placas de selección) y la eficiencia de clonación (placas de viabilidad),

respectivamente. En el caso del ensayo MLA, existen dos métodos igualmente aceptables para la clonación de la selección de mutantes; uno con agar blando y el otro con medio líquido en placas de 96 pocillos (19) (38) (39). La clonación en el ensayo TK6 se realiza utilizando medios líquidos y placas de 96 pocillos (16).

39. La trifluorotimidina (TFT) es el único agente selectivo recomendado para los mutantes *TK* (61).
40. En el MLA, las placas de agar y las placas de micropocillos se cuentan después de 10-12 días de incubación. En el TK6, las colonias de las placas de micropocillos se examinan después de 10 o 14 días en cuanto a la presencia de mutantes de aparición temprana. Con el fin de recuperar los mutantes TK6 de crecimiento lento (aparición tardía), es necesario volver a aportar a las células medio de cultivo y TFT después de haber recontado los mutantes de aparición temprana y, a continuación, incubar las placas durante un período adicional de 7-10 días (62). Véase en los puntos 42 y 44 una discusión del recuento de los mutantes *TK* de crecimiento lento y normal.
41. Los cálculos apropiados para los dos ensayos, incluidos los dos métodos (agar y micropocillos) del ensayo MLA, figuran en el apéndice 2. En el método con agar del MLA, se recuentan las colonias y se ajusta el número de colonias mutantes en función de la eficiencia de clonación para calcular la FM. En la versión con micropocillos del MLA y en el TK6, la eficiencia de clonación en las placas tanto de selección como de eficiencia de clonación se determina con arreglo a la distribución de Poisson (63). La FM se calcula a partir de estas dos eficiencias de clonación.

Caracterización de las colonias de mutantes

42. En el caso del MLA, si el producto problema es positivo (véanse los puntos 62-63), debe realizarse la caracterización de las colonias en función de su tamaño o crecimiento al menos en uno de los cultivos de ensayo (en general, a la concentración positiva más alta aceptable) y en los testigos positivos y negativos. Si el producto problema es negativo (véase el punto 64), debe procederse a la caracterización de las colonias de mutantes en los testigos positivos y negativos. En el método de micropocillos del MLA se definen los mutantes de colonias pequeñas como aquellos que cubren menos del 25 % del diámetro del pocillo y los mutantes de colonias grandes como los que cubren más del 25 % del diámetro del pocillo. En el caso del método de agar, se utiliza un contador automático de colonias para enumerar las colonias mutantes y para determinar su tamaño. En la bibliografía se detallan los enfoques relativos al tamaño de las colonias (19) (38) (40). La caracterización de las colonias en los testigos positivos y negativos es necesaria para demostrar que los estudios se llevan a cabo adecuadamente.

43. No puede determinarse que el producto problema sea negativo si no se detectan adecuadamente en el testigo positivo tanto las colonias grandes como las pequeñas. La caracterización de las colonias puede utilizarse para proporcionar información general sobre la capacidad del producto problema para causar mutaciones puntuales o fenómenos cromosómicos (punto 4).
44. TK6: los mutantes de crecimiento normal y los de crecimiento lento se diferencian por una variación en el tiempo de incubación (véase el punto 40). En el caso del TK6, en general los mutantes de aparición temprana y tardía se puntúan en relación con todos los cultivos, incluidos los testigos positivos y negativos. La caracterización de las colonias en los testigos positivos y negativos es necesaria para demostrar que los estudios se llevan a cabo adecuadamente. No puede determinarse que el producto problema sea negativo si no se detectan adecuadamente en el testigo positivo tanto los mutantes de aparición temprana como los mutantes de aparición tardía. La caracterización de las colonias puede utilizarse para proporcionar información general sobre la capacidad del producto problema para causar mutaciones puntuales o fenómenos cromosómicos (punto 4).

Competencia del laboratorio

45. Con el fin de demostrar la suficiente experiencia con el ensayo antes de utilizarlo para los ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con sustancias positivas de referencia que actúen a través de mecanismos diferentes (como mínimo, una activa con activación metabólica y otra activa sin ella, seleccionadas de entre las sustancias enumeradas en el cuadro 1) y con diversos testigos negativos (incluyendo cultivos sin tratar y diferentes disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Este requisito no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 47-50. En el caso del ensayo MLA, los valores obtenidos con los testigos tanto positivos como negativos deben ser coherentes con las recomendaciones del IWGT (véase el cuadro 2).
46. Debe investigarse una selección de sustancias testigo positivo (véase el cuadro 1) con tratamientos cortos y largos, en ausencia de activación metabólica, y también con tratamientos cortos en presencia de activación metabólica, para demostrar la capacidad de detectar productos mutágenos, para determinar la efectividad del sistema de activación metabólica y para demostrar la adecuación de las condiciones de crecimiento celular durante el tratamiento, la expresión fenotípica y la selección de mutantes, así como la de los procedimientos de examen. Debe elegirse una gama de concentraciones de las sustancias seleccionadas de forma que produzcan aumentos

sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles, para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

Datos sobre testigos históricos

47. El laboratorio debe determinar:

- un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,
- un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.

48. Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos negativos. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (64) (65).

49. La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (65)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está “controlada” en su laboratorio (66). En la bibliografía se encuentran más datos y recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (64).

50. Los datos de los testigos negativos deben consistir en frecuencias de mutantes procedentes de cultivos únicos o preferiblemente replicados, tal como se describe en el punto 27. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio. Cuando hay datos de los testigos negativos que quedan fuera del límite de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores atípicos extremos, y haya pruebas de que el sistema de ensayo está “controlado” (véase el punto 49) y de la ausencia de fallos técnicos o humanos.

51. Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de la coherencia de los datos con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

DATOS E INFORME

Presentación de los resultados

52. La presentación de los datos correspondientes a los ensayos MLA y TK6 debe incluir, tanto respecto a los cultivos tratados como a los testigos, los datos necesarios para el cálculo de la citotoxicidad (CRT o SR, respectivamente) y las frecuencias de mutantes, según se describe a continuación.
53. En el caso del ensayo MLA, deben facilitarse datos sobre los distintos cultivos en cuanto al CRS, el CRT, la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes y el número de colonias mutantes (en la versión con agar) o el número de pocillos vacíos (en la versión con micropocillos). La FM debe expresarse como número de células mutantes por millón de células supervivientes. Si la respuesta es positiva, deben darse las FM de las colonias pequeñas y grandes (y/o el porcentaje de la FM total) al menos a una concentración del producto problema (en general, la mayor concentración positiva) y con los testigos positivos y negativos. En caso de respuesta negativa, debe darse las FM de las colonias pequeñas y grandes en relación con el control negativo y el control positivo.
54. En el ensayo TK6, deben facilitarse datos sobre los distintos cultivos en relación con la SR, la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes y el número de pocillos vacíos correspondientes a los mutantes de aparición temprana y a los de aparición tardía. La FM debe expresarse como número de células mutantes por número de células supervivientes, y debe incluir la FM total, así como la FM (y/o el porcentaje de la FM total) de los mutantes de aparición temprana y de aparición tardía.

Criterios de aceptabilidad

55. Tanto en el ensayo MLA como en el TK6 deben cumplirse los siguientes criterios antes de determinar los resultados globales correspondientes a un producto problema específico:
 - Se han estudiado dos condiciones experimentales (tratamiento corto con y sin activación metabólica, véase el punto 33), salvo que se hayan obtenido resultados positivos en una de ellas.
 - Son analizables números y concentraciones apropiados de células (véanse los puntos 27 y 34-36).
 - Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritos en los puntos 28-30.

Criterios de aceptabilidad de los testigos positivos y negativos

56. El análisis, realizado por el grupo de trabajo de expertos MLA del IWGT, de una amplia cantidad de datos del MLA dio lugar a un consenso internacional en torno a

los criterios de aceptabilidad específicos del MLA (1) (2) (3) (4) (5). Por lo tanto, este método de ensayo ofrece recomendaciones específicas para determinar la aceptabilidad de los testigos negativos y positivos y para evaluar los resultados de distintas sustancias con el ensayo MLA. El TK6 tiene una base de datos mucho más pequeña y no ha sido objeto de evaluación por parte de un grupo de trabajo.

57. En el caso del ensayo MLA, se debe evaluar cada experimento para determinar si el testigo sin tratar / control del disolvente cumple los criterios de aceptación del grupo de trabajo de expertos MLA del IWGT [(4) y cuadro 2, más abajo] en relación con: 1) la FM (obsérvese que las FM aceptables para el IWGT son diferentes para la versión con agar y para la versión con micropocillos del MGA), 2) la eficiencia de clonación (EC) en el momento de la selección de los mutantes, y 3) el crecimiento en la suspensión (CS) del control del disolvente (véanse las fórmulas en el apéndice 2).

Cuadro 2: Criterios de aceptabilidad del MLA

Parámetro	Método de agar blando	Método de micropocillos
Frecuencia de mutantes	35 – 140 x 10 ⁻⁶	50 – 170 x10 ⁻⁶
Eficiencia de clonación	65 – 120 %	65 – 120 %
Crecimiento en la suspensión	8 – 32 veces (tratamiento de 3 a 4 horas) 32 – 180 veces (tratamiento de 24 horas, si se lleva a cabo)	8 – 32 veces (tratamiento de 3 a 4 horas) 32 – 180 veces (tratamiento de 24 horas, si se lleva a cabo)

58. En el caso del ensayo MLA, también debe evaluarse cada ensayo en cuanto a si el testigo o testigos positivos cumplen al menos uno de los dos criterios de aceptación siguientes, elaborados por el grupo de trabajo del IWGT:

- El testigo positivo debe mostrar un aumento absoluto de la FM total, es decir, un aumento por encima de la FM de fondo espontánea [una FM inducida (FMI)], de al menos 300 x 10⁻⁶. Al menos el 40 % de la FMI debe reflejarse en la FM de las colonias pequeñas.
- El testigo positivo tiene un aumento en la FM de las colonias pequeñas de al menos 150 x 10⁻⁶ por encima de la observada en el caso de un testigo sin tratar / control del disolvente (una FMI de las pequeñas colonias de 150 x 10⁻⁶).

59. En el caso del TK6, el ensayo será aceptable si el testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en los puntos 48-49. Además, los testigos positivos en paralelo (véase el punto 32) deben inducir respuestas compatibles con las

obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

60. En ambos ensayos, el límite superior de citotoxicidad observado en el cultivo del testigo positivo debe ser el mismo que en los cultivos experimentales. Es decir, el valor de CRT o SR no debe ser inferior al 10 %. Basta con utilizar una sola concentración (o una de las concentraciones de los cultivos de los testigos positivos si se utiliza más de una concentración) para demostrar que se cumplen los criterios de aceptación del testigo positivo. Además, la FM del testigo positivo deberá encontrarse dentro del intervalo aceptable establecido para el laboratorio.

Evaluación e interpretación de los resultados

61. En el caso del MLA, el grupo de trabajo de expertos en linfoma de ratón del IWGT ha llevado a cabo un trabajo significativo en relación con la pertinencia biológica y los criterios de respuesta positiva (4). Por lo tanto, este método de ensayo ofrece recomendaciones específicas para la interpretación de los resultados de los productos problema obtenidos con el ensayo MLA (véanse los puntos 62 a 64). El TK6 tiene una base de datos mucho más pequeña y no ha sido objeto de evaluación por parte de un grupo de trabajo. Por lo tanto, las recomendaciones para la interpretación de los datos del TK6 se dan en términos más generales (véanse los puntos 65-66). Se aplican recomendaciones adicionales a ambos ensayos (véanse los puntos 67-71).

MLA

62. Se recomienda un planteamiento para definir las respuestas positivas y negativas a fin de garantizar que el aumento de la FM es biológicamente pertinente. En lugar del análisis estadístico utilizado generalmente con otros ensayos, este planteamiento se basa en el uso de una frecuencia de mutantes inducida predefinida (es decir, el aumento de la FM por encima del control en paralelo), designada como factor de evaluación global (FEG), el cual se basa en el análisis de la distribución de los datos de FM de los testigos negativos conseguidos en los laboratorios participantes (4). Para la versión del MLA con agar, el FEG es 90×10^{-6} , y para la versión del MLA con micropocillos, el FEG es 126×10^{-6} .
63. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33), el aumento de la FM por encima del fondo de referencia en paralelo excede del FEG y el aumento está relacionado con la concentración (por ejemplo, según una prueba de tendencia). El producto problema se considera entonces capaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.
64. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales

examinadas (véase el punto 33), no hay ninguna respuesta relacionada con la concentración o, si se produce un aumento de la FM, este no supera el FEG. El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.

TK6

65. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33):

- al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,
- el aumento está relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada (véase el punto 33),
- alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 48).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (66) (67).

66. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33):

- ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,
- no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,
- todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 48).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.

Tanto con MLA como con TK6:

67. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe intentar conseguir un valor de CRT o SR entre el 20 y el 10 %. Hay consenso en cuanto a la necesidad de tener cuidado a la hora de interpretar los resultados positivos que solo se encuentren entre el 20 y el 10 % de CRT/SR, y en cuanto a no considerar

positivo un resultado si el aumento de la FM se produce solo a un valor inferior o igual al 10 % de CRT/SR (si se evalúa) (2) (59).

68. Hay algunas circunstancias en las que cierta información adicional puede ayudar a determinar que un producto problema no es mutágeno cuando no existe ningún cultivo que muestre un valor de CRT entre el 10 y el 20 % de CRT/SR. Estas situaciones se exponen a continuación: 1) No hay pruebas de mutagenicidad (por ejemplo, no hay respuesta en función de las dosis, no hay ninguna frecuencia de mutantes por encima de las registradas con los testigos negativos en paralelo o en los intervalos de fondo históricos, etc.) en una serie de puntos de datos de entre el 100 % y el 20 % de CRT/SR y hay por lo menos un punto de datos entre el 20 y el 25 % de CRT/SR. 2) No hay pruebas de mutagenicidad (por ejemplo, no hay respuesta en función de las dosis, no hay ninguna frecuencia de mutantes por encima de las registradas con los testigos negativos en paralelo o en los intervalos de fondo históricos, etc.) en una serie de puntos de datos de entre el 100 % y el 25 % de CRT/SR y hay también un punto de datos negativo ligeramente por debajo del 10 % de CRT/SR. En ambas situaciones puede concluirse que el producto problema es negativo.
69. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.
70. En los casos en que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil repetir el experimento modificando quizás las condiciones experimentales [por ejemplo, la separación entre concentraciones para aumentar la probabilidad de alcanzar puntos de datos dentro del intervalo del 10-20 % de CRT/SR, las condiciones de activación metabólica (por ejemplo, la concentración o el origen de la fracción S9) y la duración del tratamiento].
71. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos no permite que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo. Por lo tanto, debe concluirse que la respuesta del producto problema es dudosa (lo que se interpreta como que resulta igualmente probable que sea positiva o negativa).

INFORME DEL ENSAYO

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

Producto problema:

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;
- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Disolvente:

- justificación de la elección del disolvente;
- porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

Células:

En el caso de cultivos madre de laboratorio:

- tipo y origen de las células, e historia en el laboratorio de ensayo;
- características del cariotipo y/o número modal de los cromosomas;
- métodos de mantenimiento de los cultivos celulares;
- ausencia de micoplasmas;
- tiempos de duplicación de las células.

Condiciones del ensayo:

- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de los cultivos celulares; incluidos, por ejemplo, datos relativos a la citotoxicidad y limitaciones de solubilidad;
- composición de los medios, concentración de CO₂, nivel de humedad;
- concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, mM, o µg o mg/ml de medio de cultivo);
- concentración (y/o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;

- temperatura de incubación;
- tiempo de incubación;
- duración del tratamiento;
- densidad celular durante el tratamiento;
- tipo y composición del sistema de activación metabólica (origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de la mezcla S9 y de la fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9);
- sustancias testigo positivo y negativo, concentraciones finales en cada una de las condiciones de tratamiento;
- duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede);
- identidad del agente selectivo y su concentración;
- para el ensayo MLA debe indicarse la versión utilizada (agar o micropocillos);
- criterios de aceptabilidad de los estudios;
- métodos empleados para contar las células viables y las mutantes;
- métodos utilizados para medir la citotoxicidad;
- cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;
- duración de la incubación después de la siembra;
- definición de las colonias de las que se considera el tamaño y el tipo (incluidos, en su caso, los criterios de distinción de colonias “grandes” y “pequeñas”);
- criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos;
- métodos utilizados para determinar el pH y la osmolalidad, si se aplican, y la precipitación si es pertinente.

Resultados:

- número de células tratadas y número de células subcultivadas por cada cultivo;
- parámetros de toxicidad (CRT con el MLA y SR con el TK6);
- signos de precipitación y momento de la determinación;
- número de células sembradas en medio selectivo y no selectivo;
- número de colonias en medio no selectivo y número de colonias resistentes en medio selectivo, y frecuencias de mutantes correspondientes;

- determinación del tamaño de las colonias de los testigos positivos y negativos y si el producto problema es positivo, al menos a una concentración, y las frecuencias de mutantes correspondientes;
- relación concentración-respuesta, cuando sea posible;
- datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;
- datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) históricos, con intervalos, medias y desviaciones típicas; número de ensayos en los que se basan los controles históricos;
- análisis estadísticos (correspondientes a los cultivos individuales y a las réplicas combinadas, en su caso), y valores p, en su caso; y, en relación con el MLA, la evaluación del FEG.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the

International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation Res.*, 627 (1): 36-40.

- (6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- (15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.

- (16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.

- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK[±] - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK[±] 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK[±] Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK[±]-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK[±] Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK[±] Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.

- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).
- (38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- (44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.

- (46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) PNUMA (2001). Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.

- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible en: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

- (66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Anéugeno: Producto o proceso que, por interacción con los componentes del ciclo de división celular mitótica y meiótica, produce la aneuploidía de células u organismos.

Aneuploidía: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

Mutágenos por sustitución de pares de bases: Productos que provocan la sustitución de pares de bases en el ADN.

Producto: Sustancia o mezcla.

Eficiencia de clonación: Porcentaje de células sembradas a baja densidad que pueden crecer para formar una colonia que puede contarse.

Clastógeno: Producto o proceso que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

Citotoxicidad: Para los ensayos incluidos en este método de ensayo, la citotoxicidad se identifica como una reducción del crecimiento relativo total (CRT) o de la supervivencia relativa (SR) respecto a los ensayos MLA y TK6, respectivamente.

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

Mutágenos por desplazamiento del marco de lectura: Productos que provocan la adición o supresión de uno o varios pares de bases en la molécula de ADN.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o del cromosoma, con inclusión de roturas de ADN, aductos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas, y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

Recombinación mitótica: Durante la mitosis, recombinación entre cromátidas homólogas que puede dar lugar a la inducción de roturas de la doble cadena de ADN, o a una pérdida de heterocigosis.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

Frecuencia de mutantes (FM): Número de células mutantes observadas dividido por el número de células viables.

Período de expresión fenotípica: Tiempo después del tratamiento en el que la alteración genética se fija en el genoma y los eventuales productos génicos preexistentes se agotan hasta que se modifica el rasgo fenotípico.

Supervivencia relativa (SR): Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento en el ensayo TK6. Es la eficiencia de clonación relativa (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento celular ajustada para tener en cuenta la pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación del testigo negativo.

Crecimiento relativo en la suspensión (CRS): Para el ensayo MLA, el crecimiento relativo total en la suspensión durante dos días del cultivo de ensayo, en comparación con el crecimiento total en la suspensión durante dos días del testigo negativo / control del disolvente (Clive y Spector, 1975). El CRS debe incluir el crecimiento relativo del cultivo de ensayo en comparación con el testigo negativo / control del disolvente durante el período de tratamiento.

Crecimiento relativo total (CRT): Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento en el ensayo MLA. Es una medida del crecimiento relativo (comparado con el control del vehículo) de los cultivos de ensayo durante el tratamiento, el periodo de expresión de dos días y la fase de clonación de la selección de mutantes del ensayo. El CRT de cada cultivo de ensayo se multiplica por la eficiencia relativa de clonación del cultivo de ensayo en el momento de la selección de los mutantes y se expresa en relación con la eficiencia de clonación del testigo negativo / control del disolvente (Clive y Spector, 1975).

Fracciones hepáticas S9: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9 000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

Mezcla S9: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

Crecimiento en la suspensión (CS): El factor multiplicador del número de células a lo largo de las fases de tratamiento y expresión del MLA. El CS se calcula multiplicando el factor multiplicador del día 1 por el factor multiplicador del día 2 en caso de un tratamiento corto (3 o 4 horas). Si se utiliza un tratamiento de 24 horas, el CS es el factor multiplicador durante el tratamiento de 24 horas, multiplicado por los factores multiplicadores de los días 1 y 2.

Control del disolvente: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Testigos sin tratar: Cultivos que no reciben tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se someten al mismo proceso que los cultivos que reciben el producto problema.

Apéndice 2

FÓRMULAS

Citotoxicidad

Para las dos versiones del MLA (con agar y con micropocillos)

La citotoxicidad se define como el crecimiento relativo total (CRT), que incluye el crecimiento relativo en la suspensión (CRS) durante el período de expresión de 2 días y la eficiencia relativa de clonación (ERC) obtenida en el momento de la selección de los mutantes. Los valores de CRT, CRS y ERC se expresan en porcentaje.

Cálculo del CRS: El crecimiento en la suspensión uno (CS₁) es la tasa de crecimiento entre el día 0 y el día 1 (concentración celular el día 1 / concentración celular el día 0) y el crecimiento en la suspensión dos (CS₂) es la tasa de crecimiento entre el día 1 y el día 2 (concentración celular el día 2 / concentración celular el día 1). El CRS es el CS total (CS₁ x CS₂) del cultivo tratado en comparación con el testigo sin tratar / control del disolvente. Esto es: $CRS = [CS_{1(tratado)} \times CS_{2(tratado)}] / [CS_{1(testigo)} \times CS_{2(testigo)}]$ El CS₁ debe calcularse a partir de la concentración celular inicial utilizada al principio del tratamiento de las células. Esto tiene en cuenta la eventual citotoxicidad diferencial que se produzca en los cultivos de ensayo durante el tratamiento celular.

La ERC es la eficiencia relativa de clonación del cultivo tratado en comparación con la eficiencia relativa de clonación del testigo sin tratar / control del disolvente obtenida en el momento de la selección de los mutantes.

Crecimiento relativo total (CRT): $CRT = CRS \times ERC$

TK6

Supervivencia relativa (SR):

La citotoxicidad se evalúa mediante la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %). El ajuste para tener en cuenta la pérdida de células durante el tratamiento puede calcularse como sigue:

$$EC \text{ ajustada} = EC \times \frac{\text{Número de células al final del tratamiento}}{\text{Número de células al inicio del tratamiento}}$$

La SR correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$SR = \frac{EC \text{ ajustada en el cultivo tratado}}{EC \text{ ajustada en el control del disolvente}} \times 100$$

Frecuencia de mutantes tanto con MLA como con TK6

La frecuencia de mutantes (FM) es la eficiencia de clonación de las colonias mutantes en el medio selectivo (EC_M) dividida por la eficiencia de clonación en el medio no selectivo en relación en el momento de la selección (EC_V). Es decir, $FM = EC_M/EC_V$. El cálculo de estas dos eficiencias de clonación se describe a continuación para los métodos de clonación con agar y con micropocillos.

Versión del MLA con agar: En la versión del MLA con agar blando, el número de colonias en la placa de selección de mutantes (C_M) y el número de colonias en la placa de eficiencia de clonación o sin selección (recuento de viables) (C_V) se obtienen mediante el recuento directo de los clones. Para ver la eficiencia de clonación (EC) se utilizan las fórmulas siguientes cuando se siembran 600 células en las placas de selección de mutantes (EC_M) y en las placas de eficiencia de la clonación o sin selección (recuento de viables) (EC_V) y se utilizan 3×10^6 células para la selección de mutantes:

$$EC_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$EC_V = C_V / 600$$

Versión del MLA y TK6 con micropocillos: En la versión del MLA con micropocillos, los valores de C_M y C_V se determinan como el producto del número total de micropocillos (TW) y del número probable de colonias por pocillo (P) en las placas de micropocillos.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

A partir del término cero de la distribución de Poisson (Furth *et al.*, 1981), el valor de P viene dado por:

$$P = - \ln (EW / TW)$$

donde EW es el número de pocillos vacíos y TW es el número total de pocillos. Por tanto,

$$EC_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$EC_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

En el caso de la versión con micropocillos del MLA, las frecuencias de mutantes de colonias pequeñas y grandes se calcularán de la misma manera, utilizando el número pertinente de pocillos vacíos correspondientes a las colonias pequeñas y grandes.

En el caso del TK6, las frecuencias de mutantes de colonias pequeñas y grandes se basan en los mutantes de aparición temprana y de aparición tardía.

B.68. MÉTODO DE ENSAYO *IN VITRO* CON EXPOSICIÓN DE BREVE DURACIÓN PARA DETECTAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 491 de la OCDE (2017). El método de ensayo con exposición de breve duración (EBD) es un método *in vitro* que puede utilizarse en determinadas circunstancias y con limitaciones específicas para la clasificación de los peligros y el etiquetado de productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves, así como de aquellos que no requieren clasificación por lesiones oculares graves ni por irritación ocular, según se definen en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y el Reglamento (UE) n.º 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹.
2. Durante muchos años, el potencial de peligro para los ojos de los productos se ha evaluado principalmente mediante un ensayo *in vivo* con ojos de conejo [método B.5 (8), equivalente a las directrices TG 405 de la OCDE)]. Generalmente se acepta que, en un futuro próximo, ningún ensayo alternativo *in vitro* podrá sustituir completamente por sí solo el ensayo *in vivo* con ojos de conejo para evaluar toda la gama de respuestas de lesiones oculares graves o de irritación ocular que pueden causar diferentes clases de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados) sí podrán sustituir completamente al ensayo con ojos de conejo (2). El enfoque descendente está diseñado para ensayar productos de los que quepa esperar, sobre la base de la información existente, que tengan un alto potencial de irritación o provoquen lesiones oculares graves. Por el contrario, el enfoque ascendente está diseñado para ensayar productos de los que quepa esperar, sobre la base de la

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

información existente, que no provoquen una irritación ocular suficiente para exigir una clasificación. Si bien el método de ensayo EBD no se considera una sustitución completa del ensayo con ojos de conejo *in vivo*, puede utilizarse como parte de una estrategia de ensayo escalonada para la clasificación y el etiquetado normativos, como es el enfoque descendente/ascendente, para detectar sin necesidad de realizar más ensayos i) los productos que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y ii) los productos (salvo las sustancias muy volátiles y todos los productos sólidos distintos de los tensioactivos) que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1) (2). Sin embargo, un producto del que no pueda decirse mediante el método de ensayo EBD que causa lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) ni que corresponde al grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (no induce lesiones oculares graves ni irritación ocular), requeriría ensayos adicionales para establecer una clasificación definitiva. Además, hay que consultar a las autoridades reguladoras competentes antes de utilizar el ensayo EBD en un enfoque ascendente en relación con otros regímenes de clasificación distintos del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. La elección del método de ensayo más adecuado y el uso de este método de ensayo deben considerarse en el contexto del documento de orientación de la OCDE sobre un enfoque integrado de ensayos y evaluación de las lesiones oculares graves y la irritación ocular (14).

3. El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar el potencial de peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad de inducir citotoxicidad en el método de ensayo con exposición de breve duración. El efecto citotóxico de los productos en las células epiteliales de la córnea es un modo de acción importante (MDA) que lleva a lesiones epiteliales de la córnea e irritación ocular. La viabilidad celular en el método de ensayo EBD se evalúa mediante la medición cuantitativa, tras la extracción de las células, de la sal de formazano azul producida por las células vivas a través de la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)], también conocido como bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo (3). La viabilidad celular obtenida se compara con el control del disolvente (viabilidad relativa) y se utiliza para estimar el potencial de peligro para los ojos que tiene el producto problema. Un producto problema se clasifica en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP cuando tanto la concentración del 5 % como la del 0,05 % dan lugar a una viabilidad celular menor o igual ($\leq$) al 70 %. Por el contrario, un producto problema se asigna al grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP cuando tanto la concentración del 5 % como la del 0,05 % dan lugar a una viabilidad celular superior ($>$) al 70 %.

4. El término “producto problema” se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EBD al ensayo de sustancias o mezclas. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. Este método de ensayo se basa en un protocolo elaborado por Kao Corporation (4), que fue objeto de dos estudios de validación diferentes: uno por el Comité de Validación de la Sociedad Japonesa para la Alternativa a la Experimentación con Animales (Japanese Society for Alternative to Animal Experiments, JSAAE) (5) y otro por el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) (6). NICEATM/ICCVAM han efectuado una revisión por pares sobre la base de los informes de los estudios de validación y de los documentos de revisión de fondo del método de ensayo (7).
6. Cuando se utiliza para detectar productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1), los datos obtenidos con el método de ensayo EBD respecto a 125 productos (entre los que se incluyen tanto sustancias como mezclas) muestran una exactitud global del 83 % (104/125), una tasa de falsos positivos del 1 % (1/86) y una tasa de falsos negativos del 51 % (20/39) en comparación con el ensayo *in vivo* con ojos de conejo (7). La tasa obtenida de falsos negativos no es crítica en el contexto actual, ya que todos los productos problema que inducen una viabilidad celular ≤ 70 % a una concentración del 5 % y > 70 % a una concentración del 0,05 % serían analizadas posteriormente con otros métodos de ensayo *in vitro* debidamente validados o, como última opción, en el ensayo con ojos de conejo *in vivo*, en función de los requisitos normativos y de conformidad con la estrategia de evaluación secuencial y con los enfoques de ponderación de las pruebas recomendados actualmente (1) (8). Se sometieron a ensayo principalmente sustancias de un solo componente, aunque también se dispone de una cantidad limitada de datos sobre ensayos con mezclas. Sin embargo, el método de ensayo es técnicamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples y de mezclas. No obstante, antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla. El método de ensayo EBD no ha mostrado ninguna otra deficiencia específica cuando se utiliza para identificar productos problema como de categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Los investigadores podrían considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo con productos problema,

de manera que una viabilidad celular $\leq 70\%$ a las concentraciones tanto del 5 % como del 0,05 % debería aceptarse como indicativa de una respuesta inductora de lesiones oculares graves que impondría la clasificación en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP sin más ensayos.

7. Cuando se utiliza para detectar productos (sustancias y mezclas) que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (es decir, sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP), los datos obtenidos con el método de ensayo EBD respecto a 130 productos (entre los que se incluyen tanto sustancias como mezclas) muestran una exactitud global del 85 % (110/130), una tasa de falsos negativos del 12 % (9/73) y una tasa de falsos positivos del 19 % (11/57) en comparación con el ensayo *in vivo* con ojos de conejo (7). Si se excluyen del conjunto de datos las sustancias muy volátiles y las sustancias sólidas distintas de los tensioactivos, la exactitud global mejora al 90 % (92 /102), la tasa de falsos negativos al 2 % (1/54), y la de falsos positivos al 19 % (9/48) (7). Como consecuencia de ello, las posibles deficiencias del método de ensayo EBD cuando se utiliza para identificar productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) son una tasa elevada de falsos negativos para i) sustancias muy volátiles, con una presión de vapor de más de 6 kPa, y ii) productos sólidos (sustancias y mezclas) distintos de los tensioactivos y las mezclas compuestas únicamente de tensioactivos. Estos productos están excluidos del ámbito de aplicación del método de ensayo EBD (7).
8. Además de los productos mencionados en los puntos 6 y 7, el conjunto de datos generados por el método de ensayo EBD contiene también datos internos sobre 40 mezclas, que, en comparación con el ensayo ocular de Draize *in vivo*, muestran una exactitud del 88 % (35/40), una tasa de falsos positivos del 50 % (5/10), y una tasa de falsos negativos del 0 % (0/30) para asignar mezclas que no requieren clasificación con arreglo a los sistemas de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (9). Por lo tanto, el método de ensayo EBD se puede aplicar para detectar las mezclas del grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP en un enfoque ascendente, salvo las mezclas sólidas distintas de las constituidas únicamente por tensioactivos como ampliación de su limitación respecto a las sustancias sólidas. Además, las mezclas que contengan sustancias con presión de vapor superior a 6 kPa deben evaluarse con cuidado para evitar posibles subasignaciones, y deben justificarse caso por caso.
9. El método de ensayo EBD no puede utilizarse para la detección de los productos problema de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, ni de la categoría 2A (irritación ocular) o 2B (irritación ocular leve) del SGA de las Naciones Unidas, debido al considerable número de productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas que resultan subasignadas como de categoría 2, 2A o 2 B, y de

productos del grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP que resultan sobreasignadas como de categoría 2, 2A o 2B (7). A tal fin, pueden resultar necesarias pruebas adicionales con otro método adecuado.

10. El método de ensayo EBD es adecuado para los productos problema que se disuelven o suspenden uniformemente durante al menos 5 minutos en suero fisiológico, dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % en solución salina, o en aceite mineral. El método de ensayo EBD no es adecuado para los productos problema que son insolubles o que no se suspenden uniformemente durante al menos 5 minutos en suero fisiológico, dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % en solución salina, o en aceite mineral. El uso de aceite mineral en el método de ensayo EBD es posible a causa de la breve duración de la exposición. Por lo tanto, el método de ensayo EBD es adecuado para prever el potencial de peligro para los ojos que tienen los productos problema insolubles en agua (por ejemplo, cetonas o alcoholes grasos de cadena larga) siempre que sean miscibles en al menos uno de los tres disolventes propuestos (4).
11. El término “producto problema” se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo¹ y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EBD al ensayo de sustancias o mezclas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. El método de ensayo EBD consiste en un ensayo *in vitro* basado en la citotoxicidad, que se realiza con una monocapa confluyente de células de córnea de conejo del Statens Seruminstitut (SIRC), cultivadas en una microplaca de policarbonato de 96 pocillos (4). Tras una exposición de cinco minutos a un producto problema, la citotoxicidad se mide cuantitativamente como la viabilidad relativa de las células SIRC utilizando el ensayo con MTT (4). La disminución de la viabilidad celular se utiliza para predecir los posibles efectos adversos que provocan lesiones oculares.
13. Se ha informado de que el 80 % de una solución aplicada al ojo de un conejo se excreta a través del saco conjuntival en el plazo de tres o cuatro minutos, mientras que más del 80 % de una solución aplicada al ojo humano se excreta en el plazo de uno o dos minutos (10). El método de ensayo EBD intenta aproximar estos tiempos de exposición y utiliza la citotoxicidad como parámetro para evaluar el grado de las

¹ En junio de 2013, la reunión conjunta (Joint Meeting) acordó que, en la medida de lo posible, debe aplicarse ahora un uso más coherente del término “producto problema” para describir el objeto del ensayo en los métodos de ensayo nuevos y actualizados.

lesiones a las células SIRC tras una exposición de cinco minutos al producto problema.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

14. Antes de proceder al uso sistemático del método de ensayo EBD aquí descrito, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las once sustancias recomendadas en el cuadro 1. Estas sustancias se seleccionaron para representar la gama completa de respuestas en cuanto a lesiones oculares graves o irritación ocular sobre la base de los resultados de los ensayos con ojos de conejo *in vivo* (TG 405) y el sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1). Entre los otros criterios de selección figuran los siguientes: que las sustancias estén disponibles en el mercado, que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad y que se disponga de datos *in vitro* de alta calidad procedentes del método de ensayo EBD (3). Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los aquí descritos.

Cuadro 1: Lista de sustancias para la prueba de la competencia

Sustancia	N.º CAS	Clase química ¹	Estado físico	Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo <i>in vivo</i> ²	Disolvente en el ensayo EBD	Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo EBD
Cloruro de benzalconio (solución acuosa al 10 %)	8001-54-5	Compuesto onio	Líquido	Categoría 1	Solución salina	Categoría 1
Tritón X-100 (al 100 %)	9002-93-1	Éter	Líquido	Categoría 1	Solución salina	Categoría 1
Acid Red 92	18472-87-2	Compuesto heterocíclico; compuesto bromado; compuesto clorado	Sólido	Categoría 1	Solución salina	Categoría 1
Hidróxido de sodio	1310-73-2	Álcali; producto inorgánico	Sólido	Categoría 1 ³	Solución salina	Categoría 1

Butirolactona	96-48-0	Lactona; compuesto heterocíclico	Líquido	Categoría 2A (categoría 2 en CLP)	Solución salina	No puede hacerse ninguna asignación.
1-Octanol	111-87-5	Alcohol	Líquido	Categoría 2A/B ⁴ (categoría 2 en CLP)	Aceite mineral	No puede hacerse ninguna asignación.
Ciclopentanol	96-41-3	Alcohol; Hidrocarburo (cíclico)	Líquido	Categoría 2A/B ⁵ (categoría 2 en CLP)	Solución salina	No puede hacerse ninguna asignación.
Acetato de 2- etoxietilo	111-15-9	Alcohol; éter	Líquido	Sin categoría	Solución salina	Sin categoría
Dodecano	112-40-3	Hidrocarburo (acíclico)	Líquido	Sin categoría	Aceite mineral	Sin categoría
Metil-isobutil- cetona	108-10-1	Cetona	Líquido	Sin categoría	Aceite mineral	Sin categoría
Sulfato de N,N- dimetilguanidina	598-65-2	Amidina; compuesto de azufre	Sólido	Sin categoría	Solución salina	Sin categoría

Abreviaturas: N° CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

¹ Las clases químicas se han asignado utilizando la información obtenida de publicaciones anteriores del NICEATM y, en caso de no estar disponibles, utilizando el sistema National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) [a través de ChemIDplus® (National Library of Medicine), disponible en <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>] y las determinaciones de la estructura hechas por el NICEATM.

² Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1).

³ La clasificación en la categoría 1 se basa en el potencial corrosivo cutáneo del hidróxido de sodio al 100 % (incluido como producto para la prueba de la competencia con potencial corrosivo cutáneo en las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) y en el criterio para la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1).

⁴ La clasificación en las categorías 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A son necesarios dos de seis frente a cuatro de seis animales que presentan efectos el día 7. El conjunto de datos *in vivo* incluía dos estudios con tres animales cada uno. En un estudio, dos de los tres animales mostraban efectos el día 7, lo que justifica la clasificación en la categoría 2A (11), mientras que en el segundo estudio todos los parámetros con los tres animales se recuperaban hasta una puntuación de cero el día 7, lo que justifica la clasificación en la categoría 2B (12).

⁵ La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A debe haber uno de tres o bien dos de tres animales con efectos el día 7. El estudio *in vivo* incluía tres animales. Todos los parámetros salvo la opacidad de la córnea y el enrojecimiento de la conjuntiva en un solo animal se recuperaron hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no estaba recuperado completamente para el día 7 tuvo una puntuación de 1 en cuanto a la opacidad de la córnea y de 1 en cuanto al enrojecimiento de la conjuntiva (el día 7), con recuperación plena el día 14 (11).

PROCEDIMIENTO

Preparación de la monocapa celular

15. Para llevar a cabo el método de ensayo EBD debe utilizarse la línea celular de córnea de conejo SIRC. Se recomienda que las células SIRC se obtengan a partir de un banco de células adecuado, por ejemplo la CCL60 de la American Type Culture Collection.
16. Se cultivan las células SIRC a 37 °C en atmósfera humidificada y con un 5 % de CO₂, en un matraz de cultivo con medio de cultivo que comprende el medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM, 50-100 unidades/ml de penicilina y 50-100 µg/ml de estreptomicina. Las células que hayan llegado a ser confluyentes en el matraz de cultivo deben separarse por medio de la solución de tripsina con ácido etilendiaminotetraacético, eventualmente utilizando un raspador celular. Se propagan las células (por ejemplo, 2 o 3 pases) en un matraz de cultivo antes de emplearse en los ensayos sistemáticos y no deben ser objeto de más de 25 pases tras la descongelación.
17. Las celdas listas para su uso en el ensayo EBD se preparan a continuación a la densidad adecuada y se siembran en placas de 96 pocillos. La densidad de siembra celular recomendada es de $6,0 \times 10^3$ células por pocillo cuando se utilizan las células cuatro días después de la siembra, o de $3,0 \times 10^3$ células por pocillo cuando se utilizan las células cinco días después de la siembra, con un volumen de cultivo de 200 µl. Las células utilizadas en el ensayo EBD sembradas en un medio de cultivo a la densidad apropiada alcanzarán una confluencia de más del 80 % en el momento del ensayo, es decir, cuatro o cinco días después de la siembra.

Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo

18. La primera opción de disolvente para disolver o suspender los productos problema es el suero fisiológico. Si el producto problema presenta baja solubilidad o no puede disolverse o suspenderse de manera uniforme durante al menos cinco minutos en solución salina sola, se utiliza la solución salina con un 5 % de DMSO (n.º CAS 67-68-5) como segunda opción. En el caso de los productos problema que no puedan disolverse ni suspenderse de manera uniforme durante al menos cinco minutos en solución salina sola o con un 5 % de DMSO, el aceite mineral (n.º CAS 8042-47-5) se utiliza como disolvente de tercera opción.
19. Los productos problema se disuelven o suspenden uniformemente en el disolvente seleccionado, a una concentración del 5 % (p/p), y se someten posteriormente a diluciones decimales en serie hasta llegar a las concentraciones del 0,5 % y 0,05 %. Cada producto problema debe someterse a ensayo a las dos concentraciones del 5 % y del 0,05 %. Las células cultivadas en la placa de 96 pocillos se exponen a 200 µl/pocillo de la solución (o suspensión) del producto problema a la concentración del 5 % o del 0,05 % durante cinco minutos a temperatura ambiente. Los productos problema (sustancias de un solo componente o sustancias de componentes múltiples o

mezclas) se consideran sustancias puras y se diluyen o se suspenden con arreglo al método, independientemente de su pureza.

20. El medio de cultivo descrito en el punto 16 se utiliza como testigo del medio en cada placa de cada repetición. Además, las células han de exponerse también a muestras de control del disolvente en cada placa de cada repetición. Se ha confirmado que los disolventes enumerados en el punto 18 no tienen ningún efecto adverso sobre la viabilidad de las células SIRC.
21. En el método de ensayo EBD, se debe utilizar como testigo positivo en cada placa de cada repetición solución salina con un 0,01 % de laurilsulfato sódico (LSS). Para calcular la viabilidad celular del testigo positivo, cada placa de cada repetición debe incluir también un control del disolvente salino.
22. Es necesario un ensayo en blanco para determinar la compensación respecto a la densidad óptica y debe realizarse con pocillos que contengan únicamente solución salina amortiguadora de fosfato, pero sin calcio ni magnesio (PBS-) ni células.
23. Cada muestra (producto problema al 5 % y 0,05 %, testigo del medio, control del disolvente y testigo positivo) debe ensayarse por triplicado en cada repetición, exponiendo las células a 200 µl del producto problema o testigo adecuado durante cinco minutos a temperatura ambiente.
24. Es útil disponer de sustancias de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de sustancias desconocidas dentro de una clase específica de sustancias o productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

Medición de la viabilidad celular

25. Tras la exposición, las células se lavan dos veces con 200 µl de PBS y se añaden 200 µl de solución de MTT (0,5 mg MTT/ml de medio de cultivo). Tras un tiempo de reacción de dos horas en una incubadora (37 °C, 5 % de CO₂), se decanta la solución de MTT, se extrae el formazano de MTT mediante la adición de 200 µl de isopropanol-ácido clorhídrico 0,04 N durante 60 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y la absorbancia del formazano de MTT se mide a 570 nm con un lector de placas. Se produce interferencia de los productos problema con el ensayo del MTT (en caso de colorantes o reductores directos del MTT) solo si se mantiene una cantidad significativa de producto problema en el sistema de ensayo después del lavado tras la exposición, lo que sucede con los tejidos de epidermis humana reconstruida o la córnea humana reconstruida en 3D, pero no es pertinente en el caso de los cultivos celulares de 2D utilizados para el método de ensayo EBD.

Interpretación de los resultados y modelo de asignación

26. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos con cada producto problema se utilizan a continuación para calcular la viabilidad celular respecto a la del control del disolvente, que se fija arbitrariamente en el 100 %. La viabilidad celular relativa se expresa en porcentaje y se obtiene dividiendo la DO del producto problema por la DO del control del disolvente, después de restar de ambos valores la DO del ensayo en blanco.

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{(DO_{570}producto\ problema) - (DO_{570}blanco)}{(DO_{570}control\ disolvente) - (DO_{570}blanco)} \times 100$$

Análogamente, la viabilidad celular relativa se expresa en porcentaje y se obtiene dividiendo la DO del producto problema por la DO del control del disolvente, después de restar de ambos valores la DO del ensayo en blanco.

27. Deben efectuarse tres repeticiones independientes, cada una de ellas con tres pocillos replicados (es decir, n = 9). Para calcular la media aritmética de la viabilidad celular relativa se utiliza la media aritmética de los tres pocillos de cada producto problema y del control del disolvente en cada repetición independiente. La media aritmética final de la viabilidad celular se calcula a partir de las tres repeticiones independientes.

28. A continuación figuran los valores de corte de la viabilidad celular para la identificación de productos problema que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y de productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP).

Cuadro 2: Modelo de asignación del método de ensayo EBD

Viabilidad celular		Clasificación del SGA de las Naciones Unidas / CLP	Aplicabilidad
Al 5 %	Al 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Sin categoría	Sustancias y mezclas, excepto: i) las sustancias muy volátiles, con una presión de vapor de más de 6 kPa ¹ y ii) los productos sólidos (sustancias y mezclas) distintos de los tensioactivos y las mezclas que solo se componen de tensioactivos
≤ 70 %	> 70 %	No puede hacerse ninguna asignación.	No aplicable.
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoría 1	Sustancias y mezclas ²

¹ Las mezclas que contengan sustancias con presión de vapor superior a 6 kPa deben evaluarse con cuidado para evitar posibles subasignaciones, y deben justificarse caso por caso.

² Sobre la base de los resultados obtenidos principalmente con sustancias de un solo componente, aunque también existe una cantidad limitada de datos sobre los ensayos de mezclas. Sin embargo, el método de ensayo es técnicamente aplicable a los

ensayos de sustancias de componentes múltiples y de mezclas. Antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla.

Criterios de aceptación

29. Los resultados de los ensayos se consideran aceptables cuando se cumplen los siguientes criterios:

- a) La densidad óptica del testigo del medio (exposición al medio de cultivo) debe ser igual o superior a 0,3 tras restar la densidad óptica del blanco.
- b) La viabilidad del control del disolvente debe ser igual o superior al 80 % respecto al valor del testigo del medio. Si se utilizan varios testigos del disolvente en cada repetición, cada uno de estos testigos debe mostrar una viabilidad celular superior al 80 % para poder evaluar los productos problema ensayados con esos disolventes.
- c) La viabilidad celular obtenida con el testigo positivo (LSS al 0,01 %) debe encontrarse dentro del intervalo de dos veces la desviación típica respecto a la media histórica. Los límites de aceptación superior e inferior para el testigo positivo deben actualizarse con frecuencia, es decir, cada tres meses, o cada vez que se realice un ensayo aceptable en los laboratorios en los que se realizan ensayos con poca frecuencia (es decir, menos de una vez al mes). Cuando un laboratorio no complete un número suficiente de experimentos para establecer una distribución de los testigos positivos que sea estadísticamente sólida, puede utilizar los límites de aceptación superior e inferior establecidos por el diseñador del método, es decir, entre el 21,1 % y el 62,3 % en función de sus datos históricos de laboratorio, mientras que durante los primeros ensayos sistemáticos se construye una distribución interna.
- d) La desviación típica de la viabilidad celular final derivada de tres repeticiones independientes debe ser inferior al 15 % a las concentraciones tanto del 5 % como del 0,05 % del producto problema.

Si no se cumplen uno o varios de estos criterios, se deben descartar los resultados y se deben realizar otras tres repeticiones independientes.

DATOS E INFORME

Datos

30. Deben comunicarse los datos de cada pocillo (por ejemplo, valores de viabilidad celular) de cada repetición, así como la media global, la desviación típica y la clasificación.

Informe del ensayo

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

Producto problema y sustancias testigo

- Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), según su disponibilidad;
- Estado físico, volatilidad, pH, log P, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;
- Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

Condiciones y procedimientos del método de ensayo

- Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;
- Descripción del método de ensayo utilizado;
- Línea celular utilizada, su origen, número de pases y confluencia de las células utilizadas para los ensayos;
- Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;
- Número de repeticiones y réplicas utilizadas;
- Concentraciones del producto problema utilizadas (si son distintas de las recomendadas);
- Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema;
- Duración de la exposición al producto problema (si es diferente de la recomendada);
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;
- Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;
- Referencia a la media y desviación típica (DT) de los testigos positivos históricos;
- Demostración de la competencia del laboratorio para utilizar el método de ensayo (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para la prueba de la competencia) o demostración de la utilización reproducible del método de ensayo a lo largo del tiempo.

Resultados

- Respecto a cada producto problema y sustancia testigo, y cada concentración sometida a ensayo, deben indicarse en un cuadro cada uno de los valores de DO por cada pocillo replicado, la media aritmética de los valores de DO de cada repetición independiente, la viabilidad celular porcentual de cada repetición independiente y la media aritmética final de la viabilidad celular porcentual y la desviación típica de las tres repeticiones;
- Resultados de los testigos de medio, de disolvente y positivo, que demuestren el cumplimiento de los criterios adecuados de aceptación del estudio;
- Descripción de otros efectos observados;
- Clasificación general derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Quinta edición revisada. Nueva York y Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponible en: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Capítulo B.5 del presente anexo, Irritación/corrosión ocular aguda.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruselas, Bélgica.

- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442–449.
- (13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

Apéndice

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (13).

Sustancias de referencia: Sustancias utilizadas como patrón para comparar con un producto problema. Las sustancias de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) un origen u orígenes coherentes y fiables; ii) similitud estructural y funcional con la clase de sustancias objeto del ensayo; iii) características físicas y químicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

Enfoque ascendente: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se piensa que no requiere clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

Producto: Sustancia o mezcla.

Irritación ocular: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con “efectos reversibles en el ojo” y con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

Tasa de falsos negativos: Proporción de todos los productos positivos identificados erróneamente como negativos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Tasa de falsos positivos: Proporción de todos los productos negativos identificados erróneamente como positivos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Peligro: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

Testigo del medio: Muestra replicada no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

Mezcla: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

DO: Densidad óptica.

Testigo positivo: Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o clasifica correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (10).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (13).

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (10).

Lesiones oculares graves: Producción de lesiones tisulares en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con “efectos irreversibles en el ojo” y con la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

Control del disolvente/vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con el producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando

se somete a ensayo con un testigo del medio en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

Especificidad: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (13).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Tensioactivo: También denominado agente tensioactivo, es un producto, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y, de este modo, permitir que forme espuma o penetre en los sólidos. También se conoce como agente humectante.

Producto problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

Estrategia de ensayos escalonados: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento gradual de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación clara.

Enfoque descendente: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas): Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (1).

Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Véase “Lesiones oculares graves”.

Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Véase “Irritación ocular”.

Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Productos no clasificados en las categorías 1 o 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (o en las categorías 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas).

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

B.69. MÉTODO DE ENSAYO CON EPITELIO HUMANO RECONSTRUIDO SIMILAR A LA CÓRNEA (EHRSC) PARA IDENTIFICAR PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 492 de la OCDE (2017). El término *lesiones oculares graves* se refiere a la producción de lesiones tisulares en el ojo o de una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP)¹ de la Unión Europea]. También de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, el término *irritación ocular* se refiere a la producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Los productos problema que provocan lesiones oculares graves se clasifican en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, mientras que los que inducen irritación ocular se clasifican en la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Los productos problema no clasificados por irritación ocular o lesiones oculares graves se definen como aquellos que no cumplen los requisitos para la clasificación en las categorías 1 o 2 (2A o 2B) del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, es decir, se mencionan como «sin categoría» del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.
2. La evaluación de la irritación ocular / lesiones oculares graves ha supuesto normalmente la utilización de animales de laboratorio [método de ensayo B.5 (2)]. La elección del método de ensayo más adecuado y el uso de este método de ensayo deben considerarse en el contexto del documento de orientación de la OCDE sobre un enfoque integrado de ensayos y evaluación de las lesiones oculares graves y la irritación ocular (39).

¹ Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

3. Este método de ensayo describe un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de los productos (sustancias y mezclas) que no requieren clasificación y etiquetado por lesiones oculares graves o irritación ocular según el SGA de las Naciones Unidas y el CLP. Hace uso del epitelio humano reconstruido similar a la córnea (EHRSC), que imita bien las propiedades histológicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas del epitelio de córnea humana. Otros cuatro métodos de ensayo *in vitro* se han validado, se han considerado científicamente válidos y se han adoptado como métodos de ensayo B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) y B.68 (6) para evaluar el parámetro de las lesiones oculares graves / irritación ocular en la salud humana.
4. En este método de ensayo se incluyen dos ensayos validados que utilizan modelos de EHRSC disponibles comercialmente. Se han realizado estudios de validación para evaluar la irritación ocular / lesiones oculares graves (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizando el ensayo de irritación ocular (EIO) EpiOcular™ y el EIO con epitelio de córnea humana (ECH) SkinEthic™. En cada uno de ellos se utilizan como sistema de ensayo construcciones tisulares de EHRSC disponibles en el mercado, y se nombran en lo sucesivo como los métodos de referencia validados — MRV1 y MRV2, respectivamente. A partir de estos estudios de validación y de su revisión independiente por pares (9) (12) se llegó a la conclusión de que el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ son capaces de identificar correctamente los productos (tanto sustancias como mezclas) que no requieren clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves, según el SGA de las Naciones Unidas, y se recomendaron los ensayos como científicamente válidos para ese propósito (13).
5. Actualmente se acepta que, en un futuro próximo, ningún método de ensayo *in vitro* podrá sustituir completamente por sí solo al ensayo ocular de Draize *in vivo* (2) (14) para clasificar toda la gama de respuestas de lesiones oculares graves o de irritación ocular que pueden causar diferentes clases de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de varios métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados), como es el enfoque descendente/ascendente, sí podrán sustituir completamente al ensayo ocular de Draize (15). El enfoque ascendente (15) está diseñado para ser utilizado cuando, sobre la base de la información existente, se espere que un producto no cause irritación ocular suficiente para exigir una clasificación, mientras que el enfoque descendente (15) está diseñado para ser utilizado cuando, sobre la base de la información existente, se espere que un producto cause lesiones oculares graves. Se recomiendan el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ para identificar los productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y del CLP (sin categoría) sin más ensayos, en el marco de una estrategia de ensayo como el enfoque ascendente/descendente sugerido por Scott *et*

al., por ejemplo como un primer paso de un enfoque ascendente o como uno de los últimos pasos de un enfoque descendente (15). Sin embargo, el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ no pretenden diferenciar entre la categoría 1 (lesiones oculares graves) y la categoría 2 (irritación ocular) del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Esta diferenciación deberá abordarse a otro escalón de la estrategia de ensayo (15). Por tanto, un producto problema del que se sepa que hay que adjudicarle una categoría de clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con el EIO EpiOcular™ o el EIO con ECH SkinEthic™ requerirá ensayos adicionales (*in vitro* o *in vivo*) para llegar a una conclusión definitiva (sin categoría, categoría 2 o categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) utilizando, por ejemplo, los métodos de ensayo B.47, B.48, B.61 o B.68.

6. El objetivo del presente método de ensayo es describir el procedimiento utilizado a fin de evaluar el potencial de peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad de inducir citotoxicidad en una construcción tisular de EHRSC, medida con el ensayo de MTT (16) (véase el punto 21). La viabilidad del tejido del EHRSC tras la exposición a un producto problema se determina comparándola con la de los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo (% de viabilidad), y se utiliza a continuación para clasificar el potencial de peligro para los ojos del producto problema.
7. Se dispone de normas de comportamiento (17) que facilitan la validación de ensayos *in vitro* nuevos o modificados basados en el EHRSC, similares al EIO EpiOcular™ o al EIO con ECH SkinEthic™, de conformidad con los principios del documento de orientación n.º 34 de la OCDE (18), y tienen en cuenta la modificación oportuna de las directrices de ensayo TG 492 de la OCDE para su inclusión. La mutua aceptación de datos (MAD) con arreglo al acuerdo de la OCDE solo estará garantizada respecto a los ensayos validados de conformidad con las normas de comportamiento, si estos ensayos han sido revisados e incluidos en las correspondientes directrices de ensayo por la OCDE.

DEFINICIONES

8. En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

9. Este método de ensayo se basa en construcciones tisulares de EHRSC tridimensionales disponibles en el mercado que se producen bien utilizando queratinocitos epidérmicos humanos primarios (es decir, OCL-200 en el caso de EpiOcular™) o células epiteliales de córnea humana inmortalizadas (es decir, ECH/S en el caso de SkinEthic™). Las construcciones tisulares de EHRSC OCL-200 de

EpiOcular™ y ECH/S de SkinEthic™ son similares a la estructura tridimensional del epitelio de córnea *in vivo* y se producen a partir de células procedentes de la especie de interés (19) (20). Además, los ensayos miden directamente la citotoxicidad resultante de la penetración del producto a través de la córnea y la producción de lesiones celulares y tisulares; la respuesta citotóxica determina entonces el resultado global de lesiones oculares graves o irritación ocular *in vivo*. Pueden producirse lesiones celulares a través de varios modos de acción (véase el punto 20), pero la citotoxicidad desempeña un papel importante, si no el principal, en cuanto al mecanismo de la determinación de la respuesta global a un producto en forma de irritación ocular o lesiones oculares graves, y se manifiesta *in vivo* principalmente mediante opacidad de la córnea, iritis, enrojecimiento conjuntival y/o quemosis conjuntival, independientemente de los procesos fisicoquímicos que causan las lesiones tisulares.

10. En el estudio de validación en que se basa este método de ensayo se ha probado una amplia gama de productos, que abarcan una gran variedad de tipos químicos, clases químicas, pesos moleculares, log P, estructuras químicas, etc. La base de datos de validación del EIO EpiOcular™ contenía 113 productos en total, correspondientes a 95 grupos funcionales orgánicos diferentes según un análisis con la caja de herramientas QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) de la OCDE (8). La mayoría de estos productos representaban sustancias de un solo componente, pero también se incluyeron en el estudio diversas sustancias de componentes múltiples (incluidos 3 homopolímeros, 5 copolímeros y 10 cuasipolímeros). En términos de estado físico y categorías del SGA de la ONU y del CLP, los 113 productos sometidos a ensayo se distribuían como sigue: 13 líquidos de categoría 1, 15 sólidos de categoría 1, 6 líquidos de categoría 2A, 10 sólidos de categoría 2A, 7 líquidos de categoría 2B, 7 sólidos de categoría 2B, 27 líquidos sin categoría y 28 sólidos sin categoría (8). La base de datos de validación del EIO con ECH SkinEthic™ contenía 200 productos en total, correspondientes a 165 grupos funcionales orgánicos (8) (10) (11). La mayoría de estos productos representaban sustancias de un solo componente, pero también se incluyeron en el estudio diversas sustancias de componentes múltiples (incluidos 10 polímeros). En términos de estado físico y categorías del SGA de la ONU y del CLP, los 200 productos sometidos a ensayo se distribuían como sigue: 27 líquidos de categoría 1, 24 sólidos de categoría 1, 19 líquidos de categoría 2A, 10 sólidos de categoría 2A, 9 líquidos de categoría 2B, 8 sólidos de categoría 2B, 50 líquidos sin categoría y 53 sólidos sin categoría (10) (11).
11. Este método de ensayo es aplicable a sustancias y mezclas, y a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro

tratamiento previo de la muestra. No se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles. Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología del EHRSC, el actual método de ensayo no permite hacerlo.

12. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (de forma natural o previo tratamiento) y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad tisular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas. El tipo de testigos adaptados que puede ser necesario varía en función del tipo de interferencia producida por el producto problema y del procedimiento utilizado para cuantificar el formazano de MTT (véanse los puntos 36-42).
13. Los resultados obtenidos en los estudios de prevalidación (21) (22) y de validación completa (8) (10) (11) han demostrado que tanto el EIO EpiOcular™ como el EIO con ECH SkinEthic™ son transferibles a laboratorios sin experiencia previa con la realización de los ensayos y que también pueden ser reproducibles en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios. Sobre la base de estos estudios, el nivel de reproducibilidad en términos de concordancia de las asignaciones que cabe esperar del EIO EpiOcular™ a partir de datos de 113 productos es del orden del 95 % en un mismo laboratorio y del 93 % en distintos laboratorios. El nivel de reproducibilidad en términos de concordancia de las asignaciones que cabe esperar del EIO con ECH SkinEthic™ a partir de datos de 120 productos es del orden del 92 % en un mismo laboratorio y del 95 % en distintos laboratorios.
14. El EIO EpiOcular™ puede utilizarse para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el estudio de validación (8), el EIO EpiOcular™ tiene una exactitud global del 80 % (sobre 112 productos), una sensibilidad del 96 % (sobre 57 productos), una tasa de falsos negativos del 4 % (sobre 57 productos), una especificidad del 63 % (sobre 55 productos) y una tasa de falsos positivos del 37 % (sobre 55 productos), en comparación con los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Un estudio en el que se analizaron 97 formulaciones agroquímicas líquidas con el EIO EpiOcular™ demostró un comportamiento del método de ensayo con este tipo de mezclas similar al obtenido en el estudio de validación (23). Las 97 formulaciones se distribuían del siguiente modo: 21 de categoría 1, 19 de categoría 2A, 14 de categoría 2B y 43 sin categoría, clasificadas según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas sobre la base de los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de

ensayo B.5) (2) (14). Se obtuvo una exactitud global del 82 % (sobre 97 formulaciones), una sensibilidad del 91 % (sobre 54 formulaciones), una tasa de falsos negativos del 9 % sobre 54 formulaciones), una especificidad del 72 % (sobre 43 formulaciones) y una tasa de falsos positivos del 28 % (sobre 43 formulaciones) (23).

15. El EIO con ECH SkinEthic™ puede utilizarse para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el estudio de validación (10) (11), el EIO con ECH SkinEthic™ tiene una exactitud global del 84 % (sobre 200 productos), una sensibilidad del 95 % (sobre 97 productos), una tasa de falsos negativos del 5 % (sobre 97 productos), una especificidad del 72 % (sobre 103 productos) y una tasa de falsos positivos del 28 % (sobre 103 productos), en comparación con los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.
16. Las tasas de falsos negativos obtenidas con ambos ensayos EHRSC, con sustancias o con mezclas, se sitúan dentro de la probabilidad global del 12 % de que se identifiquen los productos bien como de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, bien como sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP por el ensayo ocular de Draize *in vivo*, en ensayos repetidos; esto se debe a la variabilidad dentro del ensayo que presenta el método de forma inherente (24). Las tasas de falsos positivos obtenidas con ambos ensayos EHRSC, con sustancias o con mezclas, no son críticas en el contexto del presente método, ya que todos los productos problema que inducen una viabilidad celular igual o inferior a los valores límite establecidos (véase el punto 44) requieren nuevos análisis con otros métodos de ensayo *in vitro* o, como última opción, con conejos, en función de los requisitos normativos y de conformidad con una estrategia de evaluación secuencial dentro de un enfoque de ponderación de las pruebas. Estos métodos de ensayo pueden utilizarse con todos los tipos de productos, y un resultado negativo con ellos debe aceptarse para no clasificar un producto por irritación ocular ni lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). Hay que consultar a las autoridades reguladoras competentes antes de utilizar el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ en un sistema de clasificación distinto del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.
17. Una limitación de este método de ensayo es que no permite discriminar entre irritación ocular / efectos reversibles en el ojo (categoría 2) y lesiones oculares graves / efectos irreversibles en el ojo (categoría 1) según lo definido por el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, ni entre irritantes oculares (categoría optativa 2A) e

irritantes oculares leves (categoría optativa 2B), definidos por el SGA de las Naciones Unidas (1). A estos efectos, es necesario realizar más pruebas con otros métodos de ensayo *in vitro*.

18. El término “producto problema” se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo¹ y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EHRSC al ensayo de sustancias o mezclas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

19. El producto problema se aplica tópicamente a un mínimo de dos construcciones tisulares tridimensionales de EHRSC y se mide la viabilidad de los tejidos después de la exposición y de un período de incubación tras el tratamiento. Los tejidos de EHRSC se reconstruyen a partir de queratinocitos epidérmicos humanos primarios o de células epiteliales de córnea humana inmortalizadas, que se han cultivado durante varios días para formar un epitelio escamoso estratificado y muy diferenciado, similar al encontrado en la córnea humana. La construcción tisular de EHRSC del ensayo EpiOcular™ consiste en al menos tres capas viables de células y una superficie no queratinizada, con una estructura similar a la córnea, análoga a la que se encuentra *in vivo*. La construcción tisular de EHRSC del ensayo ECH SkinEthic™ consiste en al menos cuatro capas viables de células, con inclusión de células basales cilíndricas, células de transición aladas y células superficiales escamosas, similares a las del epitelio de córnea humana normal (20) (26).
20. La irritación ocular / lesiones oculares graves inducidas por un producto, que se manifiestan *in vivo* principalmente mediante opacidad de la córnea, iritis, enrojecimiento conjuntival y/o quemosis conjuntival, son el resultado de una cascada de sucesos que comienzan por la penetración del producto a través de la córnea y/o de la conjuntiva y la producción de lesiones a las células. Estas lesiones celulares pueden producirse a través de varios modos de acción, como los siguientes: lisis de la membrana celular (por ejemplo, por agentes tensioactivos, disolventes orgánicos); coagulación de macromoléculas (en particular, proteínas) (por ejemplo, por agentes tensioactivos, disolventes orgánicos, álcalis y ácidos); saponificación de lípidos (por ejemplo, por álcalis); y alquilación u otras interacciones covalentes con macromoléculas (por ejemplo, por hipocloritos, peróxidos y alquilantes) (15) (27)

¹ En junio de 2013, la reunión conjunta (Joint Meeting) de la OCDE acordó que, en la medida de lo posible, debe aplicarse ahora un uso más coherente del término “producto problema” para describir el objeto del ensayo en las directrices de ensayo de la OCDE nuevas y actualizadas.

(28). Sin embargo, se ha demostrado que la citotoxicidad desempeña un papel importante, si no el principal, en cuanto al mecanismo de la determinación de la respuesta global a un producto en forma de irritación ocular o lesiones oculares graves, independientemente de los procesos fisicoquímicos que causan las lesiones tisulares (29) (30). Por otra parte, el potencial de lesiones oculares graves / irritación ocular de un producto se determina principalmente por la magnitud de la lesión inicial (31), que se corresponde con la magnitud de la muerte celular (29) y con la magnitud de las respuestas posteriores y los resultados finales (32). Así pues, los irritantes leves generalmente afectan solo al epitelio superficial de la córnea, los irritantes suaves y moderados dañan principalmente el epitelio y el estroma superficial, y los irritantes intensos dañan el epitelio, el estroma profundo y a veces el endotelio de la córnea (30) (33). La medición de la viabilidad de la construcción tisular de EHRSC después de la exposición tópica a un producto problema a fin de identificar los productos que no requieren clasificación por lesiones oculares graves o irritación ocular (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) se basa en el supuesto de que todos los productos que provoquen lesiones oculares graves o irritación ocular provocarán citotoxicidad en el epitelio de la córnea y/o en la conjuntiva.

21. La viabilidad tisular del EHRSC se mide clásicamente mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] por las células viables del tejido, que lo transforman en una sal azul de formazano de MTT, la cual se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (16). Los productos que no requieren clasificación y etiquetado de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP (sin categoría) se identifican como aquellos que no disminuyen la viabilidad tisular por debajo de un determinado umbral (es decir, viabilidad tisular > 60 %, en el EIO EpiOcular™ y en el EIOL con ECH SkinEthic™¹, o > 50 % en el EIOS con ECH SkinEthic™²) (véase el punto 44).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

22. Antes de proceder al uso sistemático de los ensayos con EHRSC con fines normativos, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la asignación correcta de los quince productos para la prueba de la competencia que

¹ EIOL: EIO para líquidos con ECH SkinEthic™.

² EIOS: EIO para sólidos con ECH SkinEthic™.

figuran en el cuadro 1. Estos productos se seleccionaron a partir de entre los productos utilizados en los estudios de validación de los MRV (8) (10) (11). En la selección se incluyen, en la medida de lo posible, productos que: i) tienen estados físicos diferentes; ii) abarcan toda la gama de respuestas *in vivo* de lesiones oculares graves / irritación ocular basadas en resultados de alta calidad obtenidos en el ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas (es decir, categorías 1, 2A, 2B, o sin categoría) (1) y el sistema de clasificación del CLP (es decir, categorías 1, 2 o sin categoría); iii) abarcan los diversos factores *in vivo* de la clasificación (24) (25); iv) son representativos de las clases químicas utilizadas en el estudio de validación (8) (10) (11); v) suponen una buena y amplia representación de grupos funcionales orgánicos (8) (10) (11); vi) tienen estructuras químicas bien definidas (8) (10) (11); vii) están coloreados o son reductores directos del MTT; viii) producen resultados reproducibles según los métodos de ensayo con EHRSC durante sus validaciones; ix) durante sus estudios de validación, los métodos de ensayo con EHRSC las han clasificado correctamente; x) abarcan toda la gama de respuestas *in vitro* sobre la base de los datos de alta calidad de los métodos de ensayo con EHRSC (de 0 a 100 % de viabilidad); xi) están disponibles en el comercio; y xii) no tienen asociados costes prohibitivos de adquisición ni de eliminación. En situaciones en las que un producto de la lista no esté disponible o no pueda utilizarse por otras razones justificadas, podrá utilizarse otro producto que cumpla los criterios descritos anteriormente, por ejemplo alguno de los productos utilizados en la validación del MRV. No obstante, tales desviaciones deben estar justificadas.

Cuadro 1: Lista de sustancias para la prueba de la competencia

[illegible]

Nombre químico	N.º CAS	Grupo funcional orgánico ¹	Estado físico	Viabilidad del MRV1 (%) ²	Viabilidad del MRV2 (%) ³	Asignación según el MRV	Reductor del MTT	Interf. color
Dietil-toluamida	134-62-3	Benzamidas	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	No puede hacerse ninguna asignación.	No	No
2,2-Dimetil-3-metilen-biciclo[2.2.1]heptano	79-92-5	Alcanos ramificados con carbono terciario; alquenos; bicicloheptanos; carbociclos con puente; cicloalcanos	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	No puede hacerse ninguna asignación.	No	No
Sin categoría <i>in vivo</i>⁴								
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio	342573-75-5	Alcóxidos; sales de amonio; ariolos; imidazoles; sulfatos	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Sin categoría	No	No
Éter dicaprílico	629-82-3	Alcóxidos; éteres	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Sin categoría	No	No
Butoxido de piperonilo	51-03-6	Alcóxidos; benzodioxoles; bencilos; éteres	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Sin categoría	No	No
Aceite de ricino hidrogenado con polietilenglicol (PEG-40)	61788-85-0	Acilales; alcoholes; alilos; éteres	Viscoso	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Sin categoría	No	No
1-(4-Clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)urea	101-20-2	Haluros heterocíclicos aromáticos; haluros de arilo; derivados de la urea	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Sin categoría	No	No
2,2'-Metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol	103597-45-1	Alcanos ramificados con carbono cuaternario; carbociclos aromáticos fusionados; heterociclos saturados fusionados; compuestos quinonoides precursores; terc-butilos	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Sin categoría	No	No
Tetrafluoroborato potásico	14075-53-7	Sales inorgánicas	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Sin categoría	No	No

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; SAG de las Naciones Unidas = Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (1); MRV1 = Método de referencia validado, EIO EpiOcular™; MRV2 = Método de referencia validado, EIO con ECH SkinEthic™; Interf. color = interferencia de color con la medición normal de la absorbancia [densidad óptica (DO)] del formazano de MTT.

¹ Grupo funcional orgánico asignado con arreglo a un análisis jerarquizado con la caja de herramientas 3.1 de la OCDE (8).

² Sobre la base de los resultados obtenidos en el EIO EpiOcular™ en el estudio europeo de validación de la irritación ocular por los cosméticos del LRUE del CEVMA (EIVS, Eye

Irritation Validation Study) (8).

³ Sobre la base de los resultados obtenidos en el EIO con ECH SkinEthic™ en el estudio de validación (10) (11).

⁴ Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5 / directrices TG 405 de la OCDE) (2) (14) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas.

⁵ Sobre la base de los resultados obtenidos en el estudio del Consorcio del CEFIC sobre la estrategia de ensayo de la irritación ocular *in vitro* (CON4EI).

⁶ La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A debe haber uno de tres o bien dos de tres animales con efectos el día 7. El estudio *in vivo* incluía tres animales. Todos los parámetros salvo la opacidad de la córnea en un solo animal se recuperaron hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no estaba recuperado completamente para el día 7 tuvo una puntuación de 1 en cuanto a la opacidad de la córnea (el día 7), con recuperación plena el día 9.

23. Como parte de la prueba de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del productor de la construcción tisular del EHRSC (véanse los puntos 25, 27 y 30). Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método y se haya adquirido y demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice sistemáticamente un método, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

PROCEDIMIENTO

24. Los ensayos que se acogen actualmente a este método de ensayo son el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ (9) (12) (13), mencionados como el método de referencia validado (MRV1 y MRV2, respectivamente). Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para los métodos de ensayo con EHRSC y deben emplearse cuando se aplican y utilizan los métodos de ensayo en el laboratorio (34) (35). En los puntos siguientes y en el apéndice 2 se describen los principales componentes y procedimientos de los ensayos con EHRSC.

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO CON EHRSC

Condiciones generales

25. Deben utilizarse células pertinentes de origen humano para reconstruir el tejido tridimensional de epitelio similar a la córnea, tejido que debe estar compuesto de células progresivamente estratificadas pero no queratinizadas. La construcción tisular de EHRSC se prepara en piezas con una membrana sintética porosa a través de la cual los nutrientes pueden pasar a las células. En el epitelio reconstruido similar a la córnea deben estar presentes varias capas de células epiteliales viables y no queratinizadas. La construcción tisular de EHRSC debe tener la superficie epitelial en contacto directo con el aire para permitir la exposición tópica directa de los productos problema de forma similar a la de exposición *in vivo* del epitelio corneal. La construcción tisular de EHRSC debe constituir una barrera funcional con suficiente solidez para resistir la rápida penetración de sustancias citotóxicas de referencia como, por ejemplo, Tritón X-100 o dodecilsulfato sódico (DSS). La función de barrera debe demostrarse y puede evaluarse determinando bien el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad tisular en un 50 % (TE₅₀) tras la aplicación de una sustancia de referencia a una concentración fija especificada [por ejemplo, 100 µl de Tritón X-100 al 0,3 % (v/v)], o bien la concentración a la que una sustancia de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI₅₀) tras un

tiempo fijo de exposición (por ejemplo, tratamiento de 30 minutos con 50 µl de DSS) (véase el punto 30). Las propiedades de aislamiento de la construcción tisular de EHRSC deben evitar que pase producto problema por la periferia del tejido viable, lo que podría reducir la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la córnea. Las células de origen humano utilizadas para la construcción tisular de EHRSC deben estar libres de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas y hongos. El proveedor debe comprobar la esterilidad de la construcción tisular en cuanto a la ausencia de contaminación por hongos y bacterias.

Condiciones funcionales

Viabilidad

26. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad tisular es el ensayo de MTT (16). Las células viables del conjunto tisular de EHRSC reducen el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae a continuación del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (densidad óptica, DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (36). La DO del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente reducida, es decir, $DO < 0,1$. Los usuarios de la construcción tisular de EHRSC deben asegurarse de que cada lote utilizado de esta construcción cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. En el cuadro 2 se indican los intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos correspondientes a los MRV. Como criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar los intervalos de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente en el informe del ensayo que los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad tisular) durante todo el tiempo de exposición del ensayo. El productor de tejidos debe seguir un procedimiento similar como parte del control de calidad para la aprobación de los lotes de tejidos, pero en este caso pueden ser de aplicación criterios de aceptación distintos de los especificados en el cuadro 2. El diseñador o proveedor de la construcción tisular de EHRSC debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límites superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos (en las condiciones del método de ensayo del control de calidad).

Cuadro 2: Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos (para los usuarios del ensayo)

Ensayo	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EIO EpiOcular™ (OCL-200) — MRV1 (para los protocolos tanto de líquidos como	$> 0,8^1$	$< 2,5$

de sólidos)		
EIO con ECH SkinEthic™ (ECH/S) — MRV2 (para los protocolos tanto de líquidos como de sólidos)	> 1,0	≤ 2,5

¹ Este límite de aceptación contempla la posibilidad de ampliar el tiempo de envío/conservación (por ejemplo, > 4 días), del que se ha demostrado que no afecta al comportamiento del método de ensayo (37).

Función de barrera

27. La construcción tisular de EHRSC debe tener el suficiente espesor y solidez como para resistir la penetración rápida de sustancias citotóxicas de referencia, según la estimación, por ejemplo, mediante el TE₅₀ (tritón X-100) o mediante la CI₅₀ (DSS) (cuadro 3). La función de barrera de cada lote de construcción tisular de EHRSC utilizado debe estar demostrada por el diseñador o vendedor de esta construcción en el momento del suministro de los tejidos al usuario final (véase el punto 30).

Morfología

28. El examen histológico de la construcción tisular de EHRSC debe mostrar una estructura epitelial humana similar a la córnea (con al menos tres capas de células epiteliales viables y una superficie no queratinizada). Respecto a los MRV, la morfología adecuada ha sido establecida por el diseñador o proveedor y, por tanto, no tiene que ser demostrada de nuevo por el usuario del método de ensayo para cada lote de tejidos utilizado.

Reproducibilidad

29. Los resultados de los testigos positivos y negativos del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

Control de calidad (CC)

30. La construcción tisular de EHRSC solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote utilizado de esta construcción cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 26) y a la función de barrera (punto 27). El diseñador o proveedor de la construcción tisular de EHRSC debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límites superior e inferior) para las funciones de barrera medidas mediante el TE₅₀ o la CI₅₀ (véanse los puntos 25 y 26). En el cuadro 3 figura el intervalo de aceptabilidad del TE₅₀ o de la CI₅₀ utilizado como criterio de control de calidad para la aprobación de los lotes por el diseñador o proveedor de las construcciones tisulares de EHRSC (utilizadas en los MRV). El diseñador/proveedor de las construcciones tisulares de EHRSC debe facilitar a los usuarios de los métodos de ensayo los datos que demuestren el cumplimiento de todos los criterios para la aprobación de la producción, de manera que puedan incluir esta información en el informe de ensayo. Solo los resultados obtenidos con tejidos que cumplan todos estos criterios de

aprobación de la producción pueden aceptarse para la asignación fiable de productos que no requieren clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves de conformidad con el SGA de la ONU y del CLP.

Cuadro 3: Criterio de control de calidad para la aprobación de los lotes

Ensayo	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EIO EpiOcular™ (OCL-200) — MRV1 [100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v)]	TE ₅₀ = 12,2 min	TE ₅₀ = 37,5 min
EIO con ECH SkinEthic™ (ECH/S) — MRV2 (tratamiento de 30 minutos con 50 µl de DSS)	CI ₅₀ = 1 mg/ml	CI ₅₀ = 3,2 mg/ml

Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo

31. En cada tanda deben utilizarse al menos dos réplicas tisulares con cada producto problema y cada sustancia testigo. Se utilizan dos protocolos de tratamiento diferentes, uno para productos problema líquidos y otro para productos problema sólidos (34) (35). Con ambos métodos y protocolos, la superficie de la construcción tisular debe humedecerse utilizando solución salina amortiguadora con fosfato de Dulbecco libre de calcio y magnesio (DPBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺) antes de la aplicación de los productos problema, a fin de imitar las condiciones húmedas del ojo humano. El tratamiento de los tejidos se inicia con la exposición al producto o productos problema y a las sustancias testigo. Según ambos protocolos de tratamiento de los dos MRV, debe aplicarse una cantidad suficiente de producto problema o de sustancia testigo para cubrir uniformemente la superficie epitelial, evitando una dosis excesiva (véanse los puntos 32 y 33) (apéndice 2).
32. Los productos problema que pueden pipetarse a 37 °C o a temperaturas más bajas (utilizando una pipeta de desplazamiento positivo, en caso necesario) se tratan como líquidos en los MRV; de lo contrario deben tratarse como sólidos (véase el punto 33). En los MRV, el producto problema líquido se distribuye uniformemente sobre la superficie tisular (es decir, aplicación de un mínimo de 60 µl/cm²) [véase el apéndice 2, (33) (34)]. Para garantizar la dosificación correcta del tejido deben evitarse en la medida de lo posible los efectos capilares (efectos de tensión superficial) que pueden producirse debido a los bajos volúmenes aplicados a la pieza (en la superficie tisular). Los tejidos tratados con productos problema líquidos se incuban durante 30 minutos en condiciones de cultivo normales (37 ± 2 °C , 5 ± 1 % de CO₂, ≥ 95 % de HR). Al final del período de exposición, el producto problema líquido y las sustancias testigo deben retirarse con cuidado de la superficie tisular mediante un aclarado exhaustivo con DPBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ a temperatura ambiente. Este paso de aclarado va seguido de una inmersión tras la exposición en medio fresco a temperatura ambiente (para eliminar cualquier producto problema

absorbido en el tejido) durante un plazo predeterminado que varía en función del MRV utilizado. Solo en el caso del MRV1 se aplica una incubación en medio fresco tras la exposición, en condiciones normales de cultivo, antes de realizar el ensayo del MTT [véase el apéndice 2, (34) (35)].

33. Los productos problema que no pueden pipetarse a temperaturas de hasta 37 °C se tratan como sólidos en los MRV. La cantidad de producto problema aplicado debe ser suficiente para cubrir toda la superficie tisular, es decir, debe utilizarse un mínimo de 60 mg/cm² (apéndice 2). Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. Los tejidos tratados con productos problema sólidos se incuban durante un período de tiempo predeterminado (dependiendo del MRV utilizado) en condiciones normales de cultivo [véase el apéndice 2, (34) (35)]. Al final del período de exposición, el producto problema sólido y las sustancias testigo deben retirarse con cuidado de la superficie tisular mediante un aclarado exhaustivo con DPBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ a temperatura ambiente. Este paso de aclarado va seguido de una inmersión tras la exposición en medio fresco a temperatura ambiente (para eliminar cualquier producto problema absorbido en el tejido) durante un plazo predeterminado que varía en función del MRV utilizado, y de una incubación en medio fresco tras la exposición, en condiciones normales de cultivo, antes de realizar el ensayo del MTT [véase el apéndice 2, (34) (35)].
34. En cada tanda deben incluirse testigos positivos y negativos en paralelo para demostrar que la viabilidad (determinada con el testigo negativo) y la sensibilidad (determinada con el testigo positivo) de los tejidos se encuentran dentro de intervalos de aceptación definidos sobre la base de datos históricos. El testigo negativo en paralelo también aporta la línea de base (100 % de viabilidad tisular) para calcular la viabilidad porcentual relativa de los tejidos tratados con el producto problema (% viabilidad_{ensayo}). La sustancia testigo positivo recomendada para los MRV es el acetato de metilo puro (n.º CAS 79-20-9, disponible en el comercio, por ejemplo, Sigma-Aldrich, n.º cat. 45997; líquido). Las sustancias testigo negativo recomendadas para el MRV1 y el MRV2 son H₂O ultrapura y DPBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺, respectivamente. Se trata de las sustancias testigo utilizadas en los estudios de validación de los MRV y son aquellas sobre las que se dispone de más datos históricos. El uso de otras sustancias testigo positivo o negativo adecuadas debe estar justificado científica y adecuadamente. Deben someterse a ensayo testigos positivos y negativos con el mismo protocolo o protocolos utilizados con los productos problema incluidos en la tanda (es decir, con líquidos y/o sólidos). Esta aplicación debe ir seguida de la exposición de tratamiento, el aclarado, una inmersión tras la exposición, y una incubación tras la exposición cuando proceda, tal como se describe para las tandas de los testigos en paralelo con los productos problema líquidos (véase el punto 32) o para las tandas de los testigos en paralelo con los productos problema

sólidos (véase el punto 33), antes de realizar el ensayo de MTT (véase el punto 35) (34) (35). Un único conjunto de testigos negativos y positivos es suficiente para todos los productos problema del mismo estado físico (líquidos o sólidos) incluidos en la misma tanda.

Medición de la viabilidad celular

35. El ensayo del MTT es un método cuantitativo normalizado (16) que debe utilizarse para medir la viabilidad tisular según el presente método de ensayo. Es compatible con el uso de una construcción tisular tridimensional. El ensayo del MTT se realiza inmediatamente después del período de incubación tras la exposición. En los MRV, la muestra de la construcción tisular de EHRSC se coloca en 0,3 ml de solución de MTT a 1 mg/ml durante 180 ± 15 minutos en condiciones normales de cultivo. El colorante vital MTT es reducido a un precipitado azul de formazano de MTT por las células viables de la construcción tisular de EHRSC. A continuación se extrae del tejido el precipitado azul de formazano de MTT, utilizando un volumen adecuado de isopropanol (o un disolvente similar) (34) (35). En caso de tejidos sometidos a ensayo con productos problema líquidos la extracción debe hacerse tanto de la parte superior como de la parte inferior de los tejidos, mientras que en caso de tejidos sometidos a ensayo con productos problema sólidos y con líquidos coloreados la extracción debe hacerse solo de la parte inferior de los tejidos (para minimizar cualquier posible contaminación de la solución isopropanólica de extracción con cualquier producto problema que pueda haber permanecido en el tejido). Los tejidos sometidos a ensayo con productos problema líquidos que no son fáciles de lavar también pueden extraerse únicamente de la parte inferior del tejido. Las sustancias testigo positivo y negativo ensayadas en paralelo deben tratarse de forma similar al producto problema. El formazano de MTT extraído se puede cuantificar mediante una medición normal de la absorbancia (DO) a 570 nm utilizando un paso de banda máximo de ± 30 nm o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPL (véase el punto 42) (11) (36).
36. Las propiedades ópticas del producto problema o su acción química sobre el MTT pueden interferir con la medición del formazano de MTT, lo que daría lugar a una estimación falsa de la viabilidad del tejido. Ciertos productos problema pueden interferir con la medición del formazano de MTT mediante una reducción directa del MTT a formazano de MTT azul, y/o mediante interferencia de color si el producto problema absorbe, de forma natural o debido a los procedimientos del tratamiento, en la misma gama de DO que el formazano de MTT (es decir, a alrededor de 570 ± 30 nm). Deben realizarse controles previos antes de proceder a los ensayos para permitir la identificación de posibles reductores del MTT y/o de productos que interfieran con el color, y deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir posibles interferencias de tales productos problema (véanse los puntos 37-

41). Esto es especialmente importante cuando un producto problema específico no se elimina completamente de la construcción tisular de EHRSC por el lavado o cuando penetra en el epitelio similar a la córnea y está presente, por tanto, en dicha construcción cuando se realiza el ensayo del MTT. En el caso de los productos problema que absorben luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (naturalmente o después de un tratamiento), que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia del formazano de MTT debido a una interferencia excesiva, es decir, una fuerte absorción a 570 ± 30 nm, puede emplearse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véanse los puntos 41 y 42) (11) (36). En los PNT de los MRV puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de detectar y corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (34) (35). En los apéndices III y IV se presentan, respectivamente, diagramas de flujo ilustrativos con orientaciones sobre cómo identificar y tratar los reductores directos del MTT y/o los productos que interfieren con el color en el caso del MRV1 y del MRV2, respectivamente.

37. Para identificar la posible interferencia de los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (naturalmente o después de un tratamiento) y decidir sobre la necesidad de utilizar testigos adicionales, el producto problema se añade al agua y/o al isopropanol y se incuba durante un tiempo adecuado a temperatura ambiente [véase el apéndice 2, (34) (35)]. Si el producto problema en el agua y/o isopropanol absorbe suficiente luz en el intervalo de 570 ± 20 nm con el MRV1 (véase el apéndice 3), o si se obtiene una solución coloreada cuando se mezcla el producto problema con agua con el MRV2 (véase el apéndice 4), se supone que el producto problema interfiere con la medición normal de la absorbancia del formazano de MTT y deben aplicarse otros testigos de colorante o bien debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso no serían necesarios esos otros testigos (véanse los puntos 41 y 42 y los apéndices III y IV) (34) (35). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema que interfiere debe aplicarse en al menos dos réplicas de tejido viable, que se someten al procedimiento de ensayo completo, pero se incuban con medio en lugar de con la solución de MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un testigo de color inespecífico en los tejidos vivos (NSC_{vivo}) (34) (35). El control NSC_{vivo} debe realizarse al mismo tiempo que el ensayo del producto problema coloreado y, en caso de ensayos múltiples, debe llevarse a cabo un control NSC_{vivo} independiente con cada ensayo realizado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con solución de MTT (% viabilidad_{ensayo}) menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT,

en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{vivo}), es decir, viabilidad tisular real = [% viabilidad_{ensayo}] - [% NSC_{vivo}].

38. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a una solución de MTT recién preparada. Se añade una cantidad adecuada de producto problema a una solución de MTT y la mezcla se incuba durante aproximadamente 3 horas en condiciones normales de cultivo (véanse los apéndices III y IV) (34) (35). Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema (o la suspensión en caso de productos problema insolubles) se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe aplicarse otro testigo funcional con construcciones tisulares de EHRSC inviables, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben y retienen el producto problema de forma similar a los tejidos viables. Los tejidos muertos del MRV1 se preparan por exposición a bajas temperaturas («muertos por congelación»). Los tejidos muertos del MRV2 se preparan mediante incubación prolongada (por ejemplo, al menos 24 ± 1 horas) en agua seguida de su almacenamiento a baja temperatura («muertos en agua»). Cada producto problema reductor del MTT se aplica al menos a dos réplicas de tejido muerto que se someten a todo el procedimiento de ensayo, para generar una reducción inespecífica del MTT (NSMTT) (34) (35). Un solo control NSMTT es suficiente por producto problema, independientemente del número realizado de ensayos o tandas independientes. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT (% viabilidad_{ensayo}) menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculado en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT); es decir, viabilidad tisular real = [% viabilidad_{ensayo}] - [% NSMTT].
39. Los productos problema que se identifiquen como causantes de interferencia de color (véase el punto 37) y de reducción directa del MTT (véase el punto 38) también requerirán una tercera serie de testigos cuando se realice la medición normal de la absorbancia (DO), aparte de los controles NSMTT y NSC_{vivo} que se describen en los puntos anteriores. Esto es generalmente así en el caso de los productos problema de color oscuro que absorben luz en el intervalo de 570 ± 30 nm (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 38. Esto obliga, por defecto, a utilizar controles NSMTT junto con controles NSC_{vivo}. Los productos problema para los que se aplican controles tanto NSMTT como NSC_{vivo} pueden ser absorbidos y retenidos por los tejidos vivos y muertos. Por tanto, el control NSMTT puede facilitar

la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también de la interferencia de color derivada de la absorción y retención del producto problema por los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección de la interferencia de color, puesto que el control NSC_{vivo} ya corrige la interferencia de color derivada de la absorción y retención del producto problema por los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección de la interferencia de color, es necesario aplicar un tercer control relativo al color inespecífico con tejidos muertos (NSC_{muerto}) (véanse los apéndices III y IV) (35). En este control adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto, que se someten a todo el procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo control NSC_{muerto} es suficiente por producto problema cualquiera que sea el número realizado de ensayos o tandas independientes, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema (% viabilidad_{ensayo}) menos el % NSMTT menos el % NSC_{vivo} más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSC_{muerto}), es decir, viabilidad tisular real = [% viabilidad_{ensayo}] - [% NSMTT] - [% NSC_{vivo}] + [% NSC_{muerto}].

40. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar la DO (cuando se realizan mediciones normales de absorbancia) del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro y que la reducción inespecífica del MTT puede también aumentar el área del pico de formazano de MTT (cuando se realizan mediciones mediante espectrofotometría con HPLC/UPLC) del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, es importante que cada laboratorio determine el intervalo de linealidad de DO / área bajo el pico de su espectrofotómetro con, p. ej., formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7), procedente de una fuente comercial como Sigma-Aldrich (n.º cat. M2003), antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos.
41. La medición normal de la absorbancia (DO) utilizando un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los reductores directos del MTT y los productos problema que interfieren con el color, cuando la interferencia observada con la medición de formazano de MTT no es demasiado fuerte (es decir, las DO de los extractos tisulares obtenidos con el producto problema sin corrección alguna de la reducción directa del MTT y/o de la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo lineal del

espectrofotómetro). No obstante, los resultados correspondientes a productos problema que muestran un % NSMTT o un % NSC_{vivo} ≥ 60 % (MRV1 y MRV2 con el protocolo para líquidos) o 50 % (MRV2 con el protocolo para sólidos) del testigo negativo deben tomarse con precaución, ya que este valor es el umbral utilizado en los MRV para distinguir los productos clasificados de los no clasificados (véase el punto 44). Sin embargo, la absorbancia (DO) no puede medirse normalmente cuando la interferencia con la medición del formazano de MTT es demasiado fuerte (es decir, lleva a valores de DO de los extractos tisulares del ensayo sin corregir que quedan fuera del intervalo lineal del espectrofotómetro). Los productos problema de color o los productos problema que se colorean en contacto con el agua o el isopropanol que interfieren excesivamente con la medición normal de la absorbancia (DO) del formazano de MTT pueden evaluarse todavía utilizando la espectrofotometría con HPLC/UPLC (véanse los apéndices III y IV). Esto es así porque el sistema de HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (36). Por esta razón, los controles NSC_{vivo} o NSC_{muerto} no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT (siguiendo el procedimiento descrito en el punto 38). También deben utilizarse controles NSMTT en caso de productos problema con color (intrínseco o de aparición cuando se pone en el agua) que obstaculiza la evaluación de su capacidad de reducir directamente el MTT, como se describe en el punto 38. Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula de la siguiente manera: (% viabilidad_{ensayo}) menos % NSMTT, según se describe en la última frase del apartado 38. Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse mediante los métodos de ensayo con EHRSC los reductores directos de MTT o los reductores directos de MTT que también interfieren con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (si se utiliza la medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (si se utiliza la espectrofotometría con UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.

42. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (11) (36). Debido a la diversidad de sistemas de

espectrofotometría con HPLC/UPLC, no es posible que cada usuario consiga exactamente las mismas condiciones del sistema. Antes de utilizar un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que en sí es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (36) (38). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 5. Una vez se hayan cumplido los criterios de aceptación definidos en el apéndice 5, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

Criterios de aceptación

43. Para cada tanda que utilice lotes de tejido de EHRSC que pasen el control de calidad (véase el punto 30), los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo, y no deben estar fuera de los límites históricos establecidos en el cuadro 2 (véase el punto 26). Del mismo modo, los tejidos tratados con la sustancia testigo positivo, es decir, acetato de metilo, deben mostrar una viabilidad tisular media $< 50 \%$ en relación con el testigo negativo en el MRV1, en los protocolos de líquidos o de sólidos, y $\leq 30 \%$ (protocolo de líquidos), o $\leq 20 \%$ (protocolo de sólidos) en relación con el testigo negativo en el MRV2, lo que refleja la capacidad de los tejidos para responder a un producto problema irritante en las condiciones del método de ensayo (34) (35). La variabilidad entre réplicas tisulares de productos problema y sustancias testigo debe respetar los límites aceptados [es decir, la diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20% , o la desviación típica (DT) entre tres réplicas tisulares no debe exceder del 18%]. Si el testigo negativo o el testigo positivo incluido en una tanda queda fuera de los intervalos aceptados, se considera que la tanda no es apta y debe repetirse. Si la variabilidad entre las réplicas tisulares de un producto problema está fuera del intervalo aceptado, debe considerarse que el ensayo no es apto y el producto problema debe someterse a ensayo de nuevo.

Interpretación de los resultados y modelo de asignación

44. Deben utilizarse los valores de DO / áreas bajo el pico obtenidos con los extractos tisulares replicados para cada producto problema a fin de calcular la viabilidad tisular media porcentual (media entre las réplicas tisulares) normalizadas con referencia al testigo negativo, cuyo valor se fija en el 100% . En el cuadro 4 se indica el valor porcentual de corte de la viabilidad tisular para identificar los productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin

categoría del SGA de las Naciones Unidas y CLP). Así pues, los resultados deben interpretarse como sigue:

- Se dice que el producto problema no requiere clasificación y etiquetado de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP (sin categoría) si el valor porcentual medio de la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras la exposición es superior ($>$) al valor porcentual de corte establecido de la viabilidad tisular, como se muestra en el cuadro 4. En este caso, no es necesario realizar más ensayos con otros métodos de ensayo.
- Si el valor porcentual medio de la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras la exposición es inferior o igual ($\leq$) al valor porcentual de corte establecido de la viabilidad tisular, no se podrá hacer ninguna asignación, como se muestra en el cuadro 4. En este caso, será necesario llevar a cabo ensayos adicionales con otros métodos de ensayo, ya que los métodos de ensayo con EHRSC muestran un número determinado de resultados positivos falsos (véanse los puntos 14-15) y no pueden resolverse entre las categorías 1 y 2 del SGA de la ONU y del CLP (véase el punto 17).

Cuadro 4: Modelos de asignación según la clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP

MRV	Sin categoría	No puede hacerse ninguna asignación.
MRV1 — EIO EpiOcular™ (con ambos protocolos)	Viabilidad tisular media $> 60 \%$	Viabilidad tisular media $\leq 60 \%$
MRV2 — EIO con ECH SkinEthic™ (con el protocolo de líquidos)	Viabilidad tisular media $> 60 \%$	Viabilidad tisular media $\leq 60 \%$
MRV2 — EIO con ECH SkinEthic™ (con el protocolo de sólidos)	Viabilidad tisular media $> 50 \%$	Viabilidad tisular media $\leq 50 \%$

45. Un solo ensayo compuesto al menos por dos réplicas tisulares debe ser suficiente para un producto problema, si el resultado es claro. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas y/o el de un porcentaje de viabilidad tisular media igual al $60 \pm 5 \%$ (MRV1 y MRV2 con el protocolo para líquidos) o $50 \pm 5 \%$ (MRV2 con el protocolo para sólidos), debería plantearse la conveniencia de efectuar un segundo ensayo, así como un tercero en caso de resultados discordantes entre los dos primeros.
46. A fin de mejorar el comportamiento global del método de ensayo con determinados tipos de mezclas (véase el punto 14), en relación con estos tipos de mezclas podrán tenerse en cuenta diferentes valores porcentuales de corte de la viabilidad tisular que

distingan entre productos problema clasificados y no clasificados, siempre que sea apropiado y justificable. Los productos de referencia pueden ser útiles para evaluar el potencial de irritación ocular o de lesiones oculares graves de productos problema desconocidos o clases de productos, o para evaluar el potencial relativo de toxicidad ocular de un producto clasificado en una gama específica de respuestas positivas.

DATOS E INFORME

Datos

47. Los datos de los distintos tejidos replicados de una tanda (por ejemplo, valores de DO o de área bajo el pico de formazano de MTT y valores porcentuales calculados de la viabilidad tisular relativos al producto problema y a los testigos, y la asignación final del método de ensayo con EHRSC) deben presentarse en forma de tabla para cada producto problema, incluidos los datos de ensayos repetidos, según proceda. Además, debe indicarse el valor porcentual medio de la viabilidad tisular y la diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares (si $n = 2$ tejidos replicados) o la DT (si $n \geq 3$ tejidos replicados) para cada producto problema y testigo. Se deben notificar respecto a cada producto problema las eventuales interferencias observadas que provoque este con la medición del formazano de MTT a través de la reducción directa del MTT o por interferencias de color.

Informe del ensayo

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

Producto problema

Sustancias de un solo componente

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Estado físico, volatilidad, pH, log P, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;
- Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas

- Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;
- Estado físico y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;
- Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

Sustancias testigo positivo y negativo

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Estado físico, volatilidad, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;
- Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación del uso de un testigo negativo distinto del H₂O ultrapura o de la solución DPBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺, si procede;
- Justificación del uso de un testigo positivo distinto del acetato de metilo puro, si procede;
- Referencia a los resultados de los testigos positivos y negativos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las bandas.

Información referente al promotor y al laboratorio

- Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio.

Construcción tisular de EHRSC y protocolo utilizados (justificación de las opciones elegidas, si procede)

Condiciones del método de ensayo

- Construcción tisular de EHRSC utilizada, incluido el número de lote;

- Longitud de onda y paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro);
- Descripción del método utilizado para cuantificar el formazano de MTT;
- Descripción del sistema utilizado de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede;
- Información justificativa completa sobre la construcción tisular de EHRSC concreta utilizada, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:
 - i) Control de calidad de la viabilidad (proveedor);
 - ii) Viabilidad en las condiciones del método de ensayo (usuario);
 - iii) Control de calidad de la función de barrera;
 - iv) Morfología, si se dispone de ella;
 - v) Reproducibilidad y capacidad de asignación;
 - vi) Otros controles de calidad (CC) de la construcción tisular de EHRSC, si se dispone de ellos;
- Referencia a datos históricos de la construcción tisular de EHRSC. Aquí deben incluirse, entre otras cosas, la aceptabilidad de los datos de CC con referencia a datos anteriores del lote;
- Declaración de que el laboratorio ha demostrado su competencia para el uso del método de ensayo, antes de su uso sistemático, mediante el ensayo de los productos utilizados para la prueba de la competencia.

Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo

- Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos;
- Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

Procedimiento de ensayo

- Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;
- Dosis utilizadas del producto problema y de las sustancias testigo;
- Duración y temperatura de los períodos de exposición, inmersión tras la exposición e incubación tras la exposición (en su caso);
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

- Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;
- Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (testigo positivo, testigo negativo, NSMTT, NSC_{vivo} y NSC_{muerto}, en su caso);

Resultados

- Cuadros de datos de cada producto problema y testigo, con las mediciones de cada tanda (incluidos los experimentos repetidos, en su caso) y cada réplica, incluido el valor de DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular, las diferencias entre las réplicas tisulares o las desviaciones típicas, y asignación final;
- En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o coloreados, incluido el valor de DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % NSC_{vivo}, el % NSC_{muerto}, las diferencias entre las réplicas tisulares o las desviaciones típicas, porcentaje final correcto de viabilidad tisular, y asignación final;
- Resultados obtenidos con el producto o productos problema y sustancias testigo en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;
- Descripción de otros efectos observados como, por ejemplo, coloración de los tejidos por un producto problema coloreado;

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA) ST/SG/AC.10/30/Rev. 6, sexta edición revisada, Nueva York y Ginebra: Naciones Unidas. Disponible en: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/Spnish/ST-SG-AC10-30-Rev6sp.pdf.
- (2) Capítulo B.5 del presente anexo, Irritación/corrosión ocular aguda.
- (3) Capítulo B.47 del presente anexo, Método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves.
- (4) Capítulo B.48 del presente anexo, Método de ensayo de ojo de pollo aislado para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación.
- (5) Capítulo B.61 del presente anexo, Método de ensayo de pérdida de fluoresceína para detectar agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos.
- (6) Capítulo B.68 del presente anexo, Método de ensayo *in vitro* con exposición de breve duración para detectar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.
- (8) LRUE del CEVMA (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponible en: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) Comité Consultivo Científico del CEVMA (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR

28173 EN; doi: 10.2787/043697. Disponible en:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) Comité Consultivo Científico del CEVMA (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Disponible en:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) LRUE del CEVMA (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OCDE (2016) Series on Testing and Assessment, No. 216. Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro*

Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

- (18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In*

Vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponible en: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index).
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponible en: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OCDE (2017) Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su “pertinencia”. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (18).

Producto de referencia: Producto utilizado como patrón para comparar con un producto problema. Los productos de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) tener un origen u orígenes coherentes y fiables para su identificación y caracterización; ii) presentar similitud estructural, funcional o en cuanto a la clase química o de producto con respecto al producto o productos que se somete a ensayo; iii) características fisicoquímicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos; y v) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

Enfoque ascendente: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se sospecha que no requiere clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación y etiquetado (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

Producto: Sustancia o mezcla.

Concordancia: Véase “Exactitud”.

Córnea: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

CV: Coeficiente de variación.

Desv.: Desviación.

EIO: Ensayo de irritación ocular.

LRUE del CEVMA: Laboratorio de referencia de la Unión Europea para los métodos alternativos a la experimentación con animales

Irritación ocular: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con “efectos reversibles en el ojo” y con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

TE₅₀: Tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad tisular en un 50 % tras la administración de un producto de referencia a una concentración fija determinada.

Tasa de falsos negativos: Proporción de todas las sustancias positivas identificadas

erróneamente como negativas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Tasa de falsos positivos: Proporción de todas las sustancias negativas identificadas erróneamente como positivas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Peligro: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

ECH: Epitelio de córnea humana SkinEthic™.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

CI₅₀: Concentración a la que una sustancia de referencia reduce la viabilidad tisular en un 50 % tras un tiempo fijo de exposición (por ejemplo, tratamiento de 30 minutos con DSS).

Dosis excesiva: Cantidad de producto problema aplicada a la construcción tisular de EHRSC que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie epitelial.

Efectos irreversibles en el ojo: Véase “Lesiones oculares graves”.

LIC: Límite inferior de cuantificación.

Log P: Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua.

Mezcla: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

Sustancia de un solo componente: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

Sustancia de componentes múltiples: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

Testigo negativo: Muestra que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que no induce una respuesta positiva en el sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo, y se utiliza para determinar el 10 % de viabilidad tisular.

No clasificados: Productos no clasificados por irritación ocular (categoría 2 del SGA de las

Naciones Unidas y del CLP, categorías 2A o 2B del del SGA de las Naciones Unidas) o por lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). Intercambiable con “sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP”.

NSC_{muerto}: Color inespecífico en tejidos muertos.

NSC_{vivo}: Color inespecífico en tejidos vivos.

NSMTT: Reducción inespecífica del MTT.

DO: Densidad óptica.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de referencia validado que se ha considerado científicamente válido, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (18).

Testigo positivo: Muestra que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva en el sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (18).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (18).

Ensayo de sustitución: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación de peligros o la evaluación de riesgos, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todos los productos posibles (18).

Reproducibilidad: Coincidencia entre los resultados obtenidos en el ensayo repetido del mismo producto problema utilizando el mismo protocolo de ensayo (véase “Fiabilidad”) (18).

Efectos reversibles en el ojo: Véase “Irritación ocular”.

EHRSC: Epitelio humano reconstruido similar a la córnea.

Tanda: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un testigo positivo.

DT: Desviación típica.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos problema activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (18).

Lesiones oculares graves: Producción de lesiones tisulares en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con “efectos irreversibles en el ojo” y con la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

Procedimientos normalizados de trabajo (PNT): Procedimientos escritos oficiales que describen en detalle cómo deben llevarse a cabo las operaciones de laboratorio corrientes y las específicas de cada ensayo. Son exigidas por las BPL.

Especificidad: Proporción de todos los productos negativos o inactivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (18).

Sustancia: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

Ensayo: Un solo producto problema sometido a ensayo al mismo tiempo con un mínimo de dos réplicas tisulares como se define en los correspondientes PNT.

Viabilidad tisular: Parámetro que mide la actividad total de una población celular en un tejido reconstruido como su capacidad de reducir el colorante vital MTT que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo utilizado, se corresponde con el número total y/o la vitalidad de las células vivas.

Enfoque descendente: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Estrategia de ensayos escalonados: Estrategia de ensayo por fases, que utiliza los métodos de ensayo de forma secuencial. En cada escalón se revisa toda la información existente sobre un producto problema, en un proceso de ponderación de las pruebas, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente de la estrategia. Si puede establecerse la potencia o el potencial de peligro de un producto problema sobre la base de la información disponible en un escalón dado, no hace falta efectuar más ensayos (18).

LSC: Límite superior de cuantificación.

Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas): Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Véase “Lesiones oculares graves”.

Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Véase “Irritación ocular”.

Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP: Productos que no cumplen los requisitos de clasificación en las categorías 1 o 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (o en las categorías 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas). Intercambiable con “no clasificados”.

UPLC: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

UVCB: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

Método de ensayo válido: Método de ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un método de ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (18).

Método de ensayo validado: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (18).

MRV: Método de referencia validado.

MRV1: El EIO EpiOcular™ se conoce como el método de referencia validado 1.

MRV2: El EIO con ECH SkinEthic™ se conoce como el método de referencia validado 2.

Ponderación de los datos: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de una sustancia problema.

Apéndice 2

PRINCIPALES COMPONENTES DE LOS ENSAYOS CON EHRSC PARA IDENTIFICAR PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

Componentes del ensayo	EIO EpiOcula™ (MRV1)		EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2)	
	Líquidos (pipeteables a 37 ± 1 °C o temperaturas más bajas durante 15 minutos)	Sólidos (no pipeteables)	Líquidos y viscosos (pipeteables)	Sólidos (no pipeteables)
Protocolos				
Superficie del modelo	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Número de réplicas tisulares	Al menos dos	Al menos dos	Al menos dos	Al menos dos

Componentes del ensayo	EIO EpiOcula™ (MRV1)		EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2)	
Control previo en relación con la interferencia de color	50 µl + 1 ml H₂O durante 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO₂, ≥ 95 % HR (productos problema no coloreados), o 50 µl + 2 ml de isopropanol mezclado durante 2-3 h a temperatura ambiente (productos problema coloreados) → Si la DO del producto problema a 570 ± 20 nm, tras la sustracción de la DO correspondiente al isopropanol o al agua es > 0,08 (lo que corresponde aproximadamente al 5 % de la DO media del testigo negativo), deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	50 mg + 1 ml H₂O durante 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO₂, ≥ 95 % HR (productos problema no coloreados) y/o 50 mg + 2 ml de isopropanol mezclado durante 2-3 h a temperatura ambiente (productos problema coloreados y no coloreados) → Si la DO del producto problema a 570 ± 20 nm, tras la sustracción de la DO correspondiente al isopropanol o al agua es > 0,08 (lo que corresponde aproximadamente al 5 % de la DO media del testigo negativo), deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	10 µl + 90 µl H₂O mezclada durante 30 ± 2 min, a la temperatura ambiente (18-28 °C). → Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.	10 mg + 90 µl de H₂O mezclados durante 30 ± 2 min a temperatura ambiente → Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo.
Control previo en relación con la reducción directa del MTT	50 µl + 1 ml de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min. a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO₂, ≥ 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación (se utilizan como testigo negativo 50 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT)	50 mg + 1 ml de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO₂, ≥ 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación (se utilizan como testigo negativo 50 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT)	30 µl + 300 µl de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua. (se utilizan como testigo negativo 30 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT)	30 mg + 300 µl de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % de humedad relativa → Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua. (se utilizan como testigo negativo 30 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT)

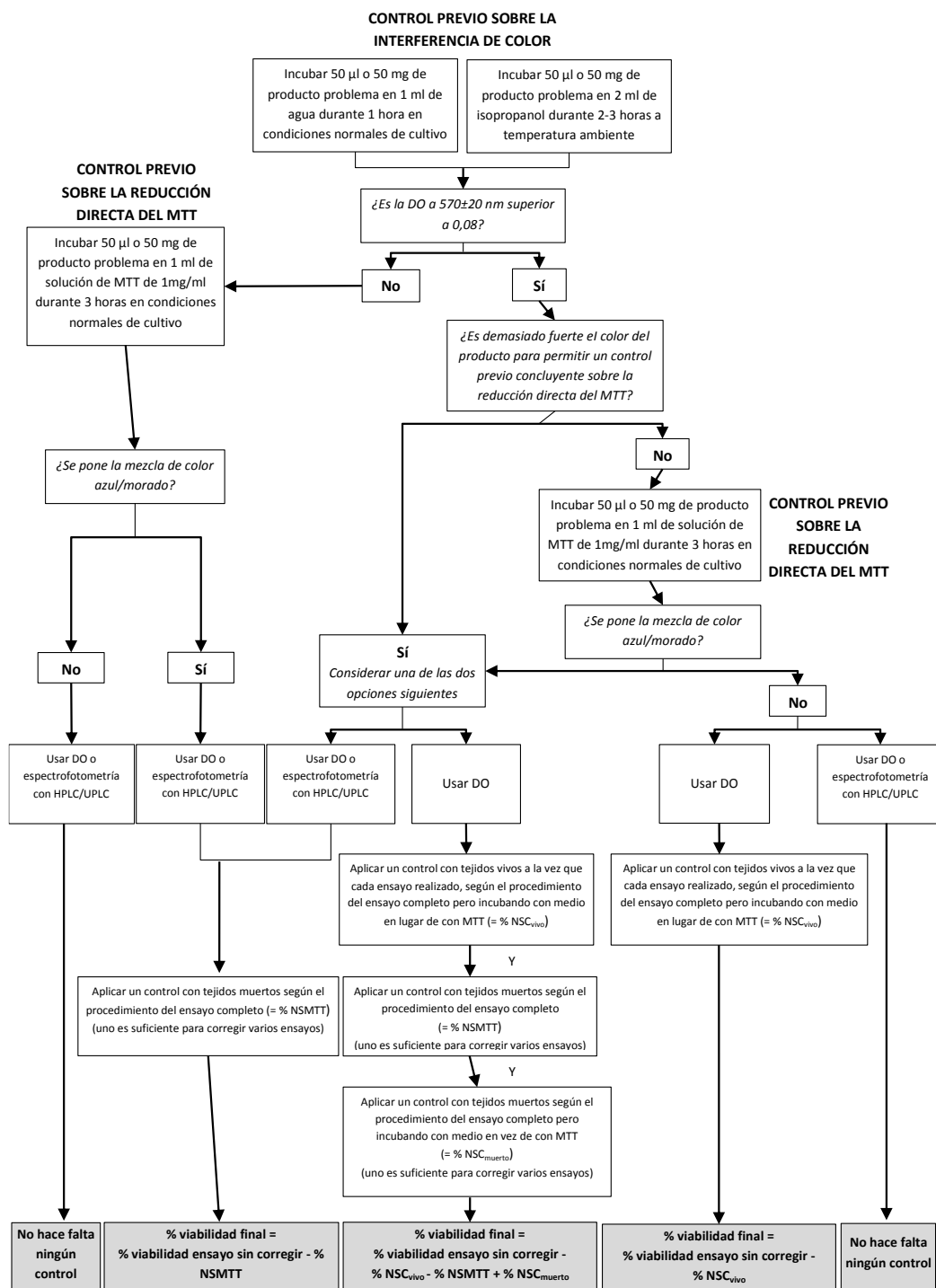
Componentes del ensayo	EIO EpiOcula™ (MRV1)		EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2)	
Pretratamiento	20 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ durante 30 ± 2 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa, protegidos de la luz.	20 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ durante 30 ± 2 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa, protegidos de la luz.	-	-
Dosis de tratamiento y aplicación	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) utilizando una herramienta calibrada (por ejemplo, una cucharada rasa calibrada para tener 50 mg de cloruro de sodio).	10 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) En caso de productos viscosos, se utiliza una malla de nailon.	30 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Tiempo y temperatura de la exposición	30 min (± 2 min) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	6 horas (± 0,25 h) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	30 min (± 2 min) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	4 horas (± 0,1 h) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa
Lavado a temperatura ambiente	3 veces en 100 ml de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3 veces en 100 ml de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Inmersión tras la exposición	12 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo	25 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo	30 min (± 2 min) a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % de humedad relativa en medio de cultivo	30 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo
Incubación tras la exposición	120 min (± 15 min) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	18 h (± 0,25 h) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	Ninguna	18 h (± 0,5 h) en medio de cultivo a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa
Testigo negativo	50 µl de H ₂ O Sometido a ensayo al mismo tiempo	50 µl de H ₂ O Sometido a ensayo al mismo tiempo	30 ± 2 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Sometido a ensayo al mismo tiempo	30 ± 2 µl de DPBS libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Sometido a ensayo al mismo tiempo

Componentes del ensayo	EIO EpiOcula™ (MRV1)		EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2)	
Testigo positivo	50 µl de acetato de metilo Sometido a ensayo al mismo tiempo	50 µl de acetato de metilo Sometido a ensayo al mismo tiempo	30 ± 2 µl de acetato de metilo Sometido a ensayo al mismo tiempo	30 ± 2 µl de acetato de metilo Sometido a ensayo al mismo tiempo
Solución de MTT	300 µl con 1 mg/ml	300 µl con 1 mg/ml	300 µl con 1 mg/ml	300 µl con 1 mg/ml
Tiempo y temperatura de incubación del MTT	180 min (± 15 min) a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	180 min (± 15 min) a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	180 min (± 15 min) a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa	180 min (± 15 min) a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humedad relativa
Disolvente de extracción	2 ml de isopropanol (extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza perforando el tejido)	2 ml de isopropanol (extracción de la parte inferior de la pieza perforando el tejido)	1,5 ml de isopropanol (extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza)	1,5 ml de isopropanol (extracción de la parte inferior de la pieza)
Tiempo y temperatura de extracción	2-3 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C	2-3 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C	4 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C	Al menos 2 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente
Lectura de la DO	570 nm (550 - 590 nm) sin filtro de referencia	570 nm (550 - 590 nm) sin filtro de referencia	570 nm (540 - 600 nm) sin filtro de referencia	570 nm (540 - 600 nm) sin filtro de referencia
Control de calidad del tejido	Tratamiento con 100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE ₅₀ ≤ 37,5 min	Tratamiento con 100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE ₅₀ ≤ 37,5 min	30 min de tratamiento con DSS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 min de tratamiento con DSS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Componentes del ensayo	EIO EpiOcula™ (MRV1)		EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2)	
Criterios de aceptación	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser $> 0,8$ y $< 2,5$. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 30 min con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser < 50 %. 3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %.	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser $> 0,8$ y $< 2,5$. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 6 horas con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser < 50 %. 3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %.	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser $> 1,0$ y $\leq 2,5$. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 30 min con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 30 %. 3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %.	1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser $> 1,0$ y $\leq 2,5$. 2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 4 horas con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 20 %. 3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %.

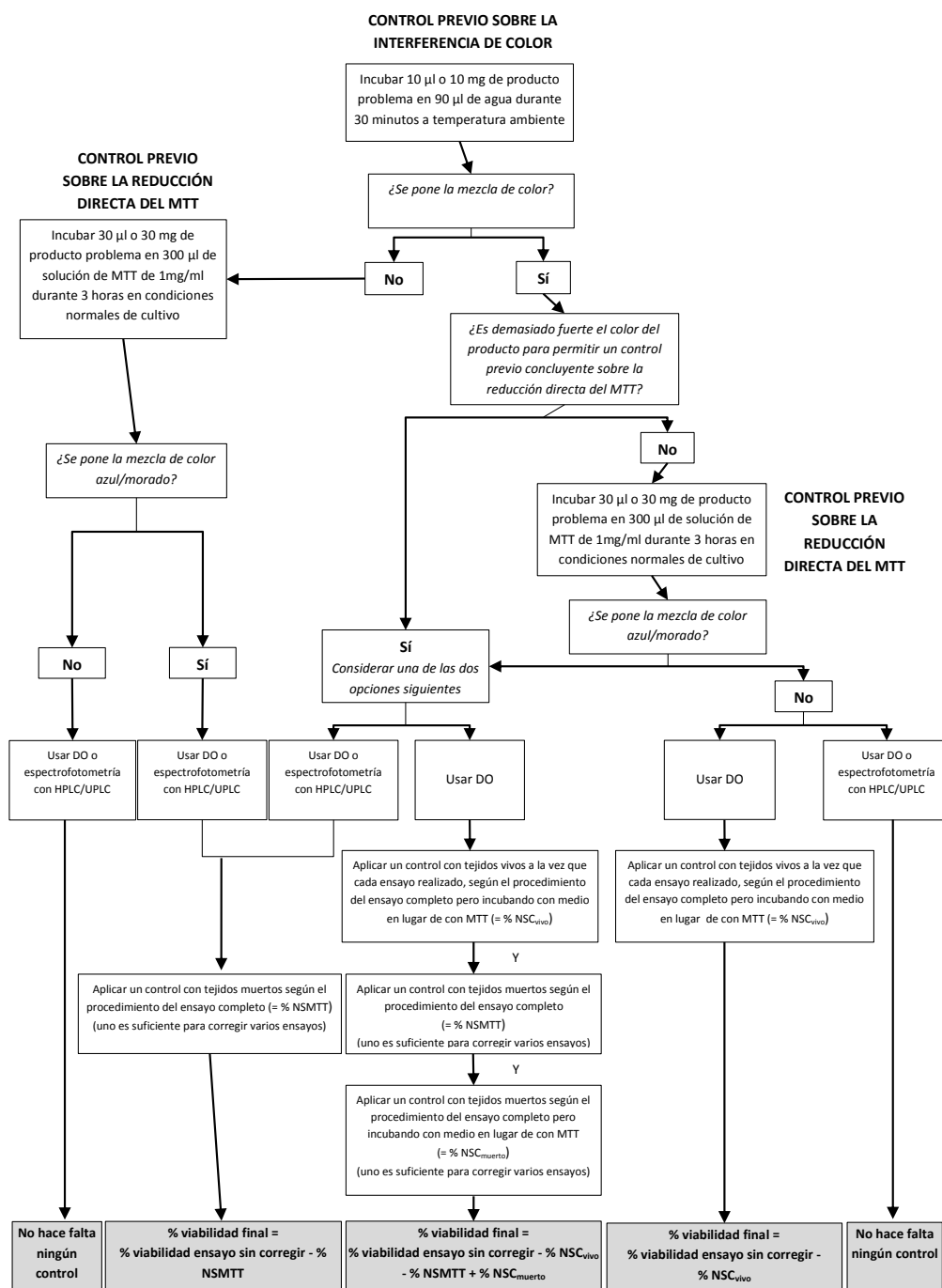
Apéndice 3

DIAGRAMA DE FLUJO ILUSTRATIVO CON ORIENTACIONES SOBRE CÓMO IDENTIFICAR Y TRATAR LOS REDUCTORES DIRECTOS DEL MTT Y/O LOS PRODUCTOS QUE INTERFIEREN CON EL COLOR, SOBRE LA BASE DE LOS PNT DEL MRV1



Apéndice 4

DIAGRAMA DE FLUJO ILUSTRATIVO CON ORIENTACIONES SOBRE CÓMO IDENTIFICAR Y TRATAR LOS REDUCTORES DIRECTOS DEL MTT Y/O LOS PRODUCTOS QUE INTERFIEREN CON EL COLOR, SOBRE LA BASE DE LOS PNT DEL MRV2



Apéndice 5

PARÁMETROS CLAVE Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CONSIDERAR APTO UN SISTEMA DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON HPLC/UPLC PARA LA MEDICIÓN DEL FORMAZANO DE MTT EXTRAÍDO DE CONSTRUCCIONES TISULARES DE EHRSC

Parámetro	Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (36) (38)	Criterios de aceptación
Selectividad	Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de construcciones tisulares de EHRSC vivo sin ningún tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de construcciones tisulares de EHRSC muerto sin ningún tratamiento)	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}^1$
Precisión	Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Exactitud	Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$
Efecto de matriz	Controles de calidad con blanco vivo (n = 5)	$85 \% \leq \% \text{ efecto de matriz } \% \leq 115 \%$
Efecto residual	Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC ²	$\text{Área}_{\text{interferencia}} \leq 20 \% \text{ del } \text{Área}_{\text{LIC}}$
Reproducibilidad (intradía)	Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml); Controles de calidad en isopropanol (n = 5)	Curvas de calibración: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ o } \leq 20 \% \text{ respecto al LIC}$ Controles de calidad: $\% \text{ Desv} \leq 15 \% \text{ y } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducibilidad (interdiaria)	Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)	
Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto tisular de EHRSC	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$
Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto tisular de EHRSC, en caso necesario	Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a -20 °C	$\% \text{ Desv} \leq 15 \%$

¹ LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.

² LSC: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos (~70 µg/ml en el MRV), es decir, 200 µg/ml.

B.70. ENSAYOS *IN VITRO* CON RECEPTOR ESTROGÉNICO RECOMBINANTE HUMANO (hrER) PARA DETECTAR PRODUCTOS CON AFINIDAD PARA UNIRSE A LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Directrices de ensayo de la OCDE sobre la base del comportamiento

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 493 de la OCDE (2015). Las TG 493 son unas directrices de ensayo basadas en el comportamiento (*performance-based test guideline*, PBTG), en las que se describe la metodología de los ensayos *in vitro* con receptores recombinantes humanos para detectar sustancias con afinidad para unirse a los receptores estrogénicos (ensayos de unión al hrER). Comprenden dos ensayos similares desde el punto de vista mecánico y funcional para la identificación de los ligandos de los receptores estrogénicos (es decir, ER α) y deben facilitar la elaboración de nuevos métodos de ensayo similares o modificados, de conformidad con los principios de validación expuestos en el documento de orientación de la OCDE sobre la validación y la aceptación internacional de métodos de ensayo nuevos o actualizados para la evaluación de peligros (*Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*) (1). Los métodos de ensayo de referencia plenamente validados (apéndice 2 y apéndice 3) que sirven de base a dichas PBTG son estos:
 - el ensayo de Freyberg-Wilson (FW) de unión a receptores estrogénicos *in vitro* utilizando un ER α recombinante humano completo (2), y
 - el ensayo *in vitro* del Instituto de Evaluación e Investigación de Productos Químicos (Chemical Evaluation and Research Institute, CERI) de unión al receptor estrogénico con utilización de una proteína con un dominio de unión al ligando recombinante humano (2).

Se dispone de normas de comportamiento (NC) (3) para facilitar el desarrollo y la validación de métodos de ensayo similares para el mismo parámetro de peligro, considerando la modificación a su debido tiempo de las PBTG 493, de manera que puedan añadirse nuevos ensayos similares a unas PBTG actualizadas. Sin embargo, la adición de ensayos similares solo se efectuará previa revisión y acuerdo por parte de la OCDE en el sentido de que se cumplen las normas de comportamiento. Los ensayos incluidos en las TG 493 pueden utilizarse indistintamente para satisfacer los requisitos de los países miembros de la OCDE en cuanto a los resultados de los ensayos sobre la unión a los receptores estrogénicos, y también se benefician de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en este método de ensayo

2. La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos, tanto de cribado como finales, de posibles alteradores endocrinos. El marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de posibles alteradores endocrinos se revisó en 2012. Los marcos conceptuales originales y revisados se incluyen como anexos en el documento de orientación sobre las directrices de ensayo normalizadas para la evaluación de los productos en cuanto a las alteraciones endocrinas (4). El marco conceptual se compone de cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica. Los ensayos de unión a receptores estrogénicos descritos en este método de ensayo son de nivel 2, que incluye los ensayos *in vitro* que aportan datos sobre los mecanismos y rutas endocrinos seleccionados. Este método se refiere a los ensayos *in vitro* de unión a receptores diseñados para identificar los ligandos del receptor estrogénico humano alfa (ER α).
3. Se ha demostrado claramente la pertinencia del ensayo *in vitro* de unión a ER respecto a funciones biológicas. Los ensayos de unión a ER están diseñados para identificar productos que pueden alterar la ruta de las hormonas estrogénicas, y han sido utilizadas ampliamente durante las dos últimas décadas para caracterizar la distribución tisular de los ER, así como para identificar agonistas/antagonistas de los ER. Estos ensayos reflejan la interacción ligando-receptor, que es la fase inicial de la vía estrogénica de señalización y es esencial para la función reproductora en todos los vertebrados.
4. La interacción de los estrógenos con los ER puede afectar a la transcripción de genes controlados por estrógenos e inducir efectos no genómicos, lo cual puede dar lugar a la inducción o a la inhibición de procesos celulares, incluidos los necesarios para la proliferación celular, el desarrollo fetal normal y la función reproductora (5) (6) (7). La perturbación de los sistemas estrogénicos normales puede provocar efectos adversos sobre el desarrollo normal (ontogénesis), la salud reproductiva y la integridad del aparato reproductor. Una señalización inadecuada de los ER puede producir efectos tales como un mayor riesgo de cáncer dependiente de hormonas, trastornos de la fertilidad y alteraciones del crecimiento y el desarrollo del feto (8).
5. Los ensayos de unión de ligandos *in vitro* se basan en la interacción directa de una sustancia con el punto de unión de un ligando a un receptor específico que regula la transcripción de un gen. El componente clave del ensayo de unión al receptor estrogénico recombinante humano alfa (hrER α) mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([^{3} H]17 β -estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando y documentar la especificidad del ER, seguido de un

experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.

6. Los estudios de validación de los ensayos de unión del CERI y de FW han demostrado su pertinencia y fiabilidad con respecto a su finalidad prevista (2).
7. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

Ámbito de aplicación y limitaciones relativas a los ensayos de unión a receptores

8. Estos ensayos se proponen para fines de cribado y establecimiento de prioridades, pero también pueden proporcionar información sobre un acontecimiento de iniciación molecular que pueda utilizarse en un enfoque de ponderación de las pruebas. Abordan la unión del producto al dominio de unión del ER α con el ligando en un sistema *in vitro*. Así pues, los resultados no deben extrapolarse directamente a la compleja señalización y regulación del sistema endocrino intacto *in vivo*.
9. La unión del ligando natural, el 17 β -estradiol, es la etapa inicial de una serie de acontecimientos moleculares que activa la transcripción de los genes diana y, en última instancia, culmina con un cambio fisiológico (9). Por lo tanto, la unión al dominio de unión del ER α con el ligando se considera uno de los mecanismos clave de la alteración endocrina (AE) con mediación de ER, aunque existen otros mecanismos a través de los cuales puede producirse la AE, entre los que se incluyen los siguientes: i) interacciones con puntos del ER α distintos de la cavidad de unión con el ligando, ii) interacciones con otros receptores pertinentes para la señalización estrogénica, ER β y receptores estrogénicos acoplados con la proteína G, otros receptores y sistemas enzimáticos dentro del sistema endocrino, iii) síntesis de hormonas, iv) activación y/o inactivación metabólica de hormonas, v) distribución de hormonas a los tejidos diana, y vi) eliminación de hormonas del organismo. Ninguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo aborda estos modos de acción.
10. Este método de ensayo aborda la capacidad de las sustancias de unirse al ER α humano y no distingue entre agonistas o antagonistas del ER α . Estos ensayos tampoco abordan otros acontecimientos posteriores, como la transcripción de genes o los cambios fisiológicos. Teniendo en cuenta que durante la validación únicamente se utilizaron sustancias de un solo componente, no se ha abordado la aplicabilidad a mezclas problema. Sin embargo, los ensayos son técnicamente aplicables a las sustancias de componentes múltiples y mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

11. Los sistemas de receptores sin células no tienen capacidad metabólica intrínseca y no han sido validados en combinación con sistemas enzimáticos metabólicos. Sin embargo, se podría incorporar la actividad metabólica en el diseño de un estudio, pero ello requeriría más esfuerzos de validación.
12. Los productos que pueden desnaturalizar la proteína (es decir, la proteína del receptor), como los tensioactivos o los productos que pueden cambiar el pH de la solución amortiguadora del ensayo, no pueden someterse a ensayo o solo a concentraciones que no presenten tales interacciones. Por lo demás, el intervalo de concentraciones que pueden utilizarse en los ensayos respecto a un producto problema está limitado por su solubilidad en la solución amortiguadora del ensayo.
13. A efectos de información, en el cuadro 1 se presentan los resultados de los ensayos correspondientes a las 24 sustancias que se estudiaron con los dos ensayos plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 17 se clasifican como ligandos del ER y 8 como no ligandos, sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de activación transcripcional de ER y/o el ensayo uterotrófico (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). En referencia a los datos resumidos en el cuadro 1, había casi un 100 % de concordancia entre los dos ensayos en la clasificación de todas las sustancias hasta 10^{-4} M, y cada sustancia se clasificó correctamente como ligando / no ligando del ER. En las normas de comportamiento aplicables a los ensayos de unión al hrER se ofrece información suplementaria sobre este grupo de sustancias, así como sobre otras sustancias objeto de ensayos de unión al hrER durante los estudios de validación (3), apéndice 2 (cuadros 1, 2 y 3).

Cuadro 1: Clasificación de sustancias como ligandos o no ligandos del ER cuando se someten a los ensayos de unión al hrER de FW y del CER1 con referencia a la respuesta prevista

	Nombre de la sustancia	N.º CAS	Respuesta prevista	Ensayo de FW		Ensayo del CER1		Clase química del MeSH	Clase de producto
				Intervalo de concentración (M)	Clasificación	Intervalo de concentración (M)	Clasificación		
1	17β-Estradiol	50-28-2	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligando	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
2	Noretinodrel	68-23-5	Ligando	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligando	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligando	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
3	Noretindrona	68-22-4	Ligando	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligando	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligando	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
4	Ftalato de di-n-butilo	84-74-2	No ligando*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando*†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando*†	Hidrocarburos (cíclicos), ésteres	Plastificantes, productos intermedios
5	DES	56-53-1	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Hidrocarburos (cíclicos), fenoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
6	17α-Etinilestradiol	57-63-6	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
7	meso-Hexestrol	84-16-2	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Hidrocarburos (cíclicos), fenoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
8	Genisteína	446-72-0	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Hidrocarburos (heterocíclicos), flavonoides	Productos naturales
9	Ecuol	531-95-3	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Metabolitos fitoestrogénicos	Productos naturales
10	Butilparabeno (4-hidroxibenzoato de n-butilo)	94-26-8	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Parabenos	Conservantes
11	Nonilfenol (mezcla)	8485-2-15-3	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Alquilfenoles	Compuestos intermedios
12	o,p'-DDT	789-02-6	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Organoclorados	Insecticidas
13	Corticosterona	50-22-6	No ligando*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	Esteroides	Productos naturales
14	Zearalenona	1792-4-92-4	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Hidrocarburos (heterocíclicos), lactonas	Productos naturales
15	Tamoxifeno	1054-0-29-1	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
16	5α-Dihidrotestosterona	521-18-6	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Esteroides, no fenólicos	Productos naturales
17	Bisfenol A	80-05-7	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Fenoles	Productos intermedios
18	4-n-Heptilfenol	1987-50-4	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Dudoso ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Alquilfenoles	Productos intermediarios
19	Kepona	143-	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times$	Ligando	Hidrocarburos	Plaguicidas

	(clordecona)	50-0		10^{-3}		10^{-3}		(halogenados)	
20	Benzo[a]antraceno	56-55-3	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	No ligando ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	No ligando ^b	Hidrocarburos aromáticos	Productos intermediarios
21	Enterolactona	78473-71-0	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligando	Fitoestrógenos	Productos naturales
22	Progesterona	57-83-0	No ligando*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	Esteroides	Productos naturales
23	Octiltrietoxisilano	2943-75-1	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	No ligando	Silanos	Modificadores de superficie
24	Atrazina	1912-24-9	No ligando*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	No ligando	Compuestos heterocíclicos	Herbicidas

* Límite de solubilidad $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* El uso y la clasificación del ftalato de di-n-butilo (DBP) como no ligando se basó en ensayos con concentraciones de hasta 10^{-4} M porque se observó que la sustancia era insoluble a concentraciones del orden de 10^{-3} M (por ejemplo, turbidez) en algunos laboratorios durante los estudios de prevalidación.

† Durante el estudio de validación, el ftalato de di-n-butilo (DBP) se sometió a ensayo como sustancia problema codificada a concentraciones de hasta 10^{-3} M. En estas condiciones, algunos laboratorios observaron una disminución de los radioligandos que se unían a la concentración más elevada (10^{-3} M) y/o un ajuste ambiguo de la curva. Con estas tandas, el DBP se clasificó como «dudoso» o «ligando» en 3/5 de los laboratorios que utilizaban el ensayo del CERI y en 5/6 de los laboratorios que utilizaban el ensayo de FW (véase la referencia (2), secciones IV.B.3.a,b y VI.A).

^a Clasificación que no coincidía con la clasificación prevista. La clasificación de 4-n-heptilfenol como «dudosa» o «no ligando» por 3/5 de los laboratorios dio lugar a una clasificación media como «dudosa». Una inspección más de cerca reveló que esto se debía a limitaciones de la solubilidad del producto que impidieron la producción de una curva completa de unión.

^b Durante el estudio de validación, el benzo[a]antraceno se reclasificó como no ligando (es decir, negativo) sobre la base de la bibliografía publicada que demostraba que la actividad estrogénica *in vitro* declarada para esta sustancia (16) depende principalmente de su activación metabólica (17)(18). La activación metabólica enzimática de la sustancia no estaría prevista en los ensayos de unión al hrER sin células, tal como se utilizan en este estudio de validación interlaboratorios. Por lo tanto, la clasificación correcta de esta sustancia es como «no ligando» cuando se utiliza en las condiciones experimentales de los ensayos de FW y del CERI.

COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER

Componentes esenciales del ensayo

- Este método de ensayo se aplica a los ensayos con un receptor ER y un ligando con la fuerza adecuada para unirse al receptor que puede utilizarse como marcador para el ensayo y puede ser desplazado con concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Los ensayos de unión contienen los dos componentes principales siguientes: 1) unión de saturación y 2) unión de competencia. El ensayo de unión de saturación se utiliza para confirmar la especificidad y la actividad de los preparados de receptores, mientras que el experimento de unión de competencia se utiliza para evaluar la capacidad de un producto problema para unirse al hrER.

Testigos

- Debe describirse la base del estrógeno de referencia y de los testigos en paralelo propuestos. Los testigos en paralelo [de disolvente (vehículo), positivos (ligando del ER; con afinidad fuerte y débil), negativos (no ligando)], según proceda, sirven para indicar que el ensayo

funciona en las condiciones de ensayo y proporcionan la base para comparar unos experimentos con otros; generalmente forman parte de los criterios de aceptabilidad de un experimento dado (1). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: 1) una concentración alta (con desplazamiento aproximadamente total del ligando radiomarcado) y media (aproximadamente la CI_{50}) de E2 y ligando débil, cada uno por triplicado; 2) el testigo de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por triplicado.

Procedimientos normales de control de calidad

16. Deben llevarse a cabo procedimientos normales de control de calidad, tal como se describe para cada ensayo, a fin de garantizar que los receptores activos, las concentraciones correctas de los productos y los límites de tolerancia se mantienen estables a lo largo de varios pases, y conservan a lo largo del tiempo la capacidad de proporcionar las respuestas esperadas de unión a los ER.

Demostración de la competencia del laboratorio

17. Antes de someter productos desconocidos a alguno de los ensayos con arreglo al presente método, cada laboratorio debe demostrar su competencia para utilizar el ensayo realizando ensayos de saturación para confirmar la especificidad y la actividad de la preparación del ER, y ensayos de unión de competencia del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). El laboratorio debe establecer una base de datos históricos con los resultados del estrógeno de referencia y de los testigos generados mediante 3-5 experimentos independientes llevados a cabo en diferentes días. Estos experimentos servirán de base para el estrógeno de referencia y los testigos históricos del laboratorio, y se utilizarán como evaluación parcial de la aceptabilidad del ensayo para futuras tandas.
18. La sensibilidad del sistema de ensayo también será confirmada mediante el ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 2. La lista de sustancias para la prueba de la competencia es un subconjunto de las sustancias de referencia que figuran en las normas de comportamiento relativas a los ensayos de unión a los ER (3). Estas sustancias están disponibles en el mercado, representan las clases de productos normalmente asociadas con la actividad de unión a los ER, presentan una gama adecuada de potencia esperada en cuanto a su unión (es decir, de fuerte a débil) y ausencia de unión (es decir, negativos). Respecto a cada sustancia para la prueba de la competencia, las concentraciones ensayadas deben cubrir el intervalo indicado en el cuadro 2. Deben realizarse al menos tres experimentos con cada sustancia y los resultados deben ser conformes a la actividad química esperada. Cada experimento debe realizarse de forma independiente (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y del reactivo), con tres réplicas por cada concentración. La competencia se demuestra por la clasificación correcta (positiva/negativa) de cada sustancia para la prueba de la competencia. Cada técnico debe realizar la prueba de la competencia al aprender los ensayos.

Cuadro 2: Lista de testigos y sustancias para la prueba de la competencia en relación con los ensayos de unión de competencia al hrER¹

N.º	Nombre de la sustancia	N.º CAS ²	Respuesta esperada ^{3,4}	Intervalo conc. ensayo (M)	Clase química según el sistema MeSH ⁵	Clase de producto ⁶
Testigos (estrógeno de referencia, ligando débil, no ligando)						
1	17β-Estradiol	50-28-2	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
2	Noretinodrel (o) noretindrona	68-23-5 (o) 68-22-4	Ligando	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
3	Octiltrietoxisilano	2943-75-1	No ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silanos	Modificadores de superficie
Sustancias para la prueba de la competencia⁶						
4	Dietilestilbestrol	56-53-1	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarburos (cíclicos), fenoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
5	17α-Etinilestradiol	57-63-6	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Esteroides	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
6	<i>meso</i> -Hexestrol	84-16-2	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarburos (cíclicos), fenoles	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
7	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarburos (cíclicos)	Productos farmacéuticos, productos veterinarios
8	Genisteína	446-72-0	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Compuestos heterocíclicos, flavonoides	Productos naturales
9	Bisfenol A	80-05-7	Ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenoles	Productos intermedios
10	Zearalonona	17924-92-4	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Compuestos heterocíclicos, lactonas	Productos naturales

11	Butilparabenos	94-26-8	Ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Ácidos carboxílicos, fenoles	Conservantes
12	Atrazina	1912-24-9	No ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Compuestos heterocíclicos	Herbicidas
13	Ftalato de di-n-butilo (DBP) ⁷	84-74-2	No ligando ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Hidrocarburos (cíclicos), ésteres	Plastificantes, productos intermedios
14	Corticosterona	50-22-6	No ligando	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Esteroides	Productos naturales

¹ Si una sustancia para la prueba de la competencia deja de estar disponible en el comercio, puede utilizarse una sustancia con la misma clasificación en cuanto a la unión a los ER, con una potencia comparable y la misma clase química.

² Abreviaturas: N° CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

³ Clasificación como ligandos o no ligandos del ER α durante el estudio de validación de los ensayos de unión al hrER de FW y del CER1 (2).

⁴ La actividad en cuanto a la unión a los ER se basó en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los ensayos de unión a los ER y TA (9), así como en datos empíricos y otra información obtenida de estudios de referencia publicados y revisados (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (diponible en: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

⁷ El DBP puede utilizarse como no ligando testigo alternativo ensayado a una concentración máxima de 10^{-4} M.

⁸ El límite de solubilidad de esta sustancia es 10^{-4} M. El uso y la clasificación del ftalato de di-n-butilo (DBP) como no ligando se basó en ensayos a concentraciones de hasta 10^{-4} M porque se observó que la sustancia era insoluble a la concentración de 10^{-3} M (por ejemplo, turbidez) en algunos laboratorios durante los estudios de prevalidación.

Ensayo de solubilidad y determinación del intervalo de concentraciones de los productos problema

19. Debe realizarse un ensayo preliminar para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al realizar el ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y se confirma después en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no deberá ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un control del disolvente, junto con ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, sobre la base del límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado. Las concentraciones en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta.

Criterios de aceptabilidad de las tandas de ensayo

20. La aceptación o el rechazo de una tanda de ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con el estrógeno de referencia y el testigo utilizados para cada experimento. En primer lugar, para la placa 1, las curvas completas de concentración de los testigos de referencia de cada experimento deben cumplir los criterios de comportamiento con parámetros de ajuste de las curvas (por ejemplo, CI_{50} y pendiente de Hill), sobre la base de los resultados comunicados en relación con los respectivos protocolos de los ensayos del CERI y de FW (apéndices 2 y 3), y de los datos de controles históricos del laboratorio que realice el ensayo. Todos los testigos (estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando) deben clasificarse correctamente en cada experimento. En segundo lugar, los testigos de todas las placas posteriores deben evaluarse en cuanto a su coherencia con la placa 1. Debe utilizarse un intervalo suficiente de concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior de la curva de unión de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas independientes, debe ser razonable y científicamente justificable. La capacidad de realizar el ensayo de forma coherente debe demostrarse mediante la elaboración y el mantenimiento de una base de datos históricos sobre el estrógeno de referencia y los testigos. Las desviaciones típicas (DT) o los coeficientes de variación (CV) de las medias de los parámetros de ajuste de las curvas del estrógeno de referencia y de los ligandos débiles testigo a partir de experimentos múltiples pueden utilizarse como medida de la reproducibilidad intralaboratorios. A la hora de revisar los resultados de los testigos de las placas de cada tanda, así como respecto a cada producto problema, debe aplicarse un juicio profesional.

Además, deben seguirse los siguientes principios en relación con los criterios de aceptabilidad:

- Los datos deben ser suficientes para una evaluación cuantitativa de la unión a los ER;
- Las concentraciones ensayadas deben mantenerse dentro del intervalo de solubilidad del producto problema.

Análisis de los datos

21. El procedimiento definido de análisis de los datos relativos a la unión de saturación y de competencia deben respetar los principios clave para caracterizar las interacciones receptor-ligando. Normalmente, los datos relativos a la unión de saturación se analizan utilizando un modelo de regresión no lineal que tiene en cuenta la unión total y la inespecífica. Al determinar los parámetros B_{max} y K_d , puede ser necesario efectuar una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos [p. ej., Swillens, 1995 (19)]. Los datos procedentes de la unión de competencia suelen transformarse [por ejemplo, porcentaje de unión específica y concentración del producto problema ($\log M$)]. Deben estimarse los valores de $\log CI_{50}$ de cada producto problema, utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros. Tras el análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión visual y con los parámetros de ajuste de la curva sobre el grado de calidad del ajuste de los datos de la unión con la curva de unión de competencia generada. En algunos casos, puede ser necesario realizar un análisis adicional para obtener el mejor ajuste de la curva (por ejemplo, limitar la parte superior y/o inferior de la curva, utilizar la regla del 10 %); véase el apéndice 4 y la referencia 2 (sección III.A.2).
22. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad (punto 20) indica que el sistema de ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier ensayo concreto produzca datos exactos. La reproducción de los resultados correctos del primer ensayo es la mejor indicación de que se han producido datos exactos.

Criterios generales de interpretación de los datos

23. Actualmente no se dispone de un método aceptado universalmente para interpretar los datos de la unión al ER. Sin embargo, tanto las evaluaciones cualitativas (por ejemplo, ligando / no ligando) como las cuantitativas [por ejemplo, $\log CI_{50}$, afinidad relativa de unión (*Relative Binding Affinity*, RBA)] de la actividad mediada por el hrER deben basarse en datos empíricos y en un sólido juicio científico.

Informe del ensayo

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

Ensayo:

- ensayo utilizado;

Testigo/ producto de referencia /producto problema

- origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;
- estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

- medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancia de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores; pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

- caracterización (naturaleza, proveedor y lote);
- justificación de la elección del disolvente o vehículo;
- solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Receptores:

- fuente de receptores (proveedor, número de catálogo, lote, especie del receptor, concentración del receptor activo facilitada por el proveedor, certificación del proveedor);
- caracterización de los receptores (incluidos los resultados de la unión de saturación): K_d , B_{max} ;
- conservación de los receptores;
- ligandos radiomarcados:
- proveedor, número de catálogo, lote, actividad específica.

Condiciones del ensayo:

- limitaciones de la solubilidad en las condiciones del ensayo;
- composición de la solución amortiguadora del ligando;
- concentración del receptor;
- concentración del marcador (por ejemplo, ligando radiomarcado);
- concentraciones del producto problema;
- porcentaje del vehículo en el ensayo final;
- temperatura y duración de la incubación;

- método de separación entre sustancia unida y libre;
- testigos positivos y negativos / sustancias de referencia;
- criterios empleados para considerar que los resultados de los ensayos son positivos, negativos o dudosos.

Comprobación de la aceptabilidad:

- valores reales de CI_{50} y pendiente de Hill, correspondientes a los testigos positivos en paralelo y a las sustancias de referencia.

Resultados:

- datos brutos y datos sobre la sustancia unida y libre;
- comprobación de confirmación de la desnaturalización, si procede;
- si existe, concentración efectiva mínima (CE_{Min});
- valores de RBA y/o de CI_{50} , según proceda;
- relación concentración-respuesta, cuando sea posible;
- análisis estadísticos, en su caso, junto con una medida del error y de la confianza (por ejemplo, SEM, DT, CV o IC del 95 %) y una descripción de cómo se han obtenido dichos valores.

Discusión de los resultados:

- aplicación de la regla del 10 %.

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) OCDE (2015): Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, París.
- (3) OCDE (2015): Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): p. 1073-89.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- (13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Apéndice 1

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Regla del 10 %: Opción de excluir de los análisis los puntos de datos en los que la media de las réplicas tiene un valor porcentual de unión específica al [³H]17β-estradiol que es igual o superior al 10 % del valor medio a una concentración inferior (véase el apéndice 4).

Criterios de aceptabilidad: Normas mínimas para la realización de controles experimentales y patrones de referencia. Para que un experimento se considere válido deben cumplirse todos los criterios de aceptabilidad.

Exactitud (concordancia): Grado de coincidencia entre los resultados de un ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de “concordancia” se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (1).

MC: Marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

Producto: Sustancia o mezcla.

CV: Coeficiente de variación.

E2: 17β-Estradiol

AE: Alteración endocrina.

hERα: Receptor estrogénico humano alfa.

ER: Receptor estrogénico.

Actividad estrogénica: Capacidad de un producto para imitar al 17β-estradiol en su posibilidad de unirse a los receptores estrogénicos y activarlos. La unión al hERα puede detectarse con este método de ensayo.

CI₅₀: Concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima.

ICCVAM: Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos de Estados Unidos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que distintos laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias, pueden producir resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (1).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un

protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (1).

CE_{Mín}: Concentración efectiva mínima; es la concentración más baja del producto problema que produce una respuesta (es decir, la concentración más baja del producto problema en la que el factor de inducción es estadísticamente diferente al del control del vehículo en paralelo).

Ensayos de imitación: Expresión coloquial para denominar los ensayos que son estructural y funcionalmente similares a un método de ensayo de referencia validado y aceptado. También se pueden denominar métodos de ensayo similares.

PBTG: Directrices de ensayo basadas en el comportamiento (*Performance-Based Test Guideline*).

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluye lo siguiente: 1) los componentes esenciales del ensayo; 2) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y 3) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (1).

Sustancias para la prueba de la competencia: Subconjunto de las sustancias de referencia incluidas en las normas de comportamiento que pueden ser utilizadas por los laboratorios para demostrar la competencia técnica con un ensayo normalizado. Los criterios de selección de estas sustancias suelen incluir que representen la gama de respuestas, que estén disponibles en el mercado y que se disponga sobre ellas de datos de referencia de alta calidad.

Competencia: Capacidad demostrada de realizar correctamente un ensayo antes de someter a este sustancias desconocidas.

Estrógeno de referencia: 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Métodos de ensayo de referencia: Ensayos sobre los que se basan las PBTG 493.

RBA: Afinidad relativa de unión (*Relative Binding Affinity*). La RBA de una sustancia se calcula como porcentaje del log CI₅₀ de la sustancia respecto al log CI₅₀ del 17β-estradiol.

Pertinencia: Descripción de la relación de un ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (1).

Fiabilidad: Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios.

DT: Desviación típica.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Método de ensayo validado: Ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (1).

Validación: Proceso por el que se establece para un fin determinado la fiabilidad y pertinencia de un enfoque, método, ensayo, proceso o evaluación concretos (1).

Apéndice 2

ENSAYOS DE FREYBERGER-WILSON DE UNIÓN DE SATURACIÓN Y DE COMPETENCIA A RECEPTORES ESTROGÉNICOS (ER α) *IN VITRO* UTILIZANDO EL ER α RECOMBINANTE HUMANO COMPLETO

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de unión de saturación y de competencia a receptores estrogénicos (ER α) *in vitro* utiliza un receptor ER α humano completo (hrER α) que se produce en células de insectos infectadas con baculovirus, de las que después se aísla. El protocolo, elaborado por Freyberger y Wilson, fue sometido a un estudio de validación internacional multilaboratorios (2), que demostró su pertinencia y fiabilidad para la finalidad prevista del ensayo.
2. Este ensayo es un procedimiento de cribado para identificar sustancias que pueden unirse al hrER α completo. Se utiliza para determinar la capacidad de un producto problema de competir con el 17 β -estradiol para unirse al hrER α . Los resultados cuantitativos del ensayo pueden incluir la CI₅₀ (medida de la concentración del producto problema necesaria para desplazar la mitad del [³H]17 β -estradiol del hrER α) y las afinidades relativas de unión de los productos problema respecto al hrER α en comparación con el 17 β -estradiol. A efectos de cribado de los productos problema, entre los resultados cualitativos aceptables de los ensayos pueden incluirse la clasificación de los productos problema como ligandos o no ligandos del hrER α , o bien si el resultado es dudoso sobre la base de los criterios descritos para las curvas de unión.
3. El ensayo utiliza un ligando radiactivo, lo que impone al laboratorio la obligación de disponer de una licencia de materiales radiactivos. Todos los procedimientos con radioisótopos y productos peligrosos deben ajustarse a las normas y procedimientos descritos en la legislación nacional.
4. Las secciones “**INTRODUCCIÓN GENERAL**” y “**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER**” deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El ensayo de unión al hrER α mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([³H]17 β -estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando

radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor.

6. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando, seguido de un experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.
7. El objetivo del experimento de unión de saturación es caracterizar un determinado lote de receptores en cuanto a su afinidad de unión y número para preparar el experimento de unión de competencia. El experimento de unión de saturación mide, en condiciones de equilibrio, la afinidad de una concentración fija del receptor estrogénico por su ligando natural (representada por la constante de disociación, K_d) y la concentración de puntos activos de unión de los receptores (B_{max}).
8. El experimento de unión de competencia mide la afinidad de una sustancia para competir con el $[^3H]17\beta$ -estradiol en cuanto a la unión al ER. La afinidad se cuantifica por la concentración del producto problema que, en equilibrio, inhibe el 50 % de la unión específica del $[^3H]17\beta$ -estradiol (denominada "concentración inhibitoria del 50 %" o CI_{50}). También puede evaluarse utilizando la afinidad relativa de unión (RBA, en relación con la CI_{50} del estradiol medida aparte en la misma tanda). El experimento de unión de competencia mide la unión del $[^3H]17\beta$ -estradiol a una concentración fija en presencia de una amplia gama de concentraciones (ocho órdenes de magnitud) del producto problema. A continuación, se ajustan los datos, en la medida de lo posible, a una forma de la ecuación de Hill (Hill, 1910) que describe el desplazamiento del radioligando por un ligando competitivo de un solo punto de unión. La magnitud del desplazamiento del estradiol radiomarcado en equilibrio se utiliza para caracterizar el producto problema como ligando, no ligando, o generador de una respuesta dudosa.

PROCEDIMIENTO

Demostración del comportamiento aceptable de la proteína del hrER α

9. Con anterioridad a la realización sistemática de los ensayos de unión de saturación y de competencia, se debe demostrar que cada nuevo lote de hrER α presenta un comportamiento correcto en el laboratorio en el que se va a utilizar. Para demostrar el comportamiento debe seguirse un proceso de dos fases. Se trata de las siguientes:
 - Realizar un ensayo de unión de $[^3H]17\beta$ -estradiol de saturación para demostrar la especificidad y saturación del hrER α . El análisis de regresión no lineal de estos datos (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) y la consiguiente gráfica de Scatchard deben documentar la afinidad de unión al hrER α del $[^3H]17\beta$ -estradiol (K_d) y el número de receptores (B_{max}) respecto a cada lote del hrER α .

- Llevar a cabo un ensayo de unión de competencia utilizando las sustancias testigo [estrógeno de referencia (17β -estradiol)], un ligando débil (por ejemplo, noretinodrel o noretindrona), y un no ligando (octiltrietoxisilano, OTES). Cada laboratorio debe establecer una base de datos históricos para documentar la coherencia de la CI_{50} y de otros valores pertinentes sobre el estrógeno de referencia y el ligando débil entre experimentos y diferentes lotes de hrER α . Los parámetros de las curvas de unión de competencia de las sustancias testigo deben estar dentro de los límites del intervalo de confianza del 95 % (véase el cuadro 1) que se han establecido utilizando datos de los laboratorios que participaron en el estudio de validación de este ensayo (2).

Cuadro 1: Criterios de comportamiento establecidos para el estrógeno de referencia y el ligando débil, ensayo de FW de unión al hrER.

Sustancia	Parámetro	Media ^a	Desviación típica (n)	Intervalos de confianza del 95 % ^b	
				Límite inferior	Límite superior
17β-Estradiol	Parte superior (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Parte inferior (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Pendiente de Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log CI ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Parte superior (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Parte inferior (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pendiente de Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log CI ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrona^c	Parte superior (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Parte inferior (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pendiente de Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log CI ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Los valores de la media (n) ± desviación típica (DT) se calcularon utilizando estimaciones de los parámetros de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) con tandas de testigos realizadas en cuatro laboratorios durante el estudio de validación (véase el anexo N de la referencia 2).

^b Los intervalos de confianza del 95 % se aportan como guía para los criterios de aceptabilidad.

^c El ensayo de noretindrona era opcional para la subtask 4 durante el estudio de validación (en la referencia 2, véase la subtask 4). Así pues, los valores de la media ± DT (n) se calcularon utilizando estimaciones de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) en relación con tandas de control realizadas en dos laboratorios.

El intervalo de la CI₅₀ dependerá de la K_d del preparado del receptor y de la concentración de ligando radiomarcado utilizada en cada laboratorio. Será aceptable un ajuste adecuado del intervalo de la CI₅₀ sobre la base de las condiciones utilizadas para realizar el ensayo.

Demostración del comportamiento del laboratorio

- Véanse los puntos 17 y 18 y el cuadro 2 de la sección “**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER**” de este método de ensayo. Cada ensayo (unión de saturación y de competencia) debe consistir en tres tandas independientes (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y de los reactivos) en días diferentes, y cada tanda debe contener tres réplicas.

Determinación de la concentración del receptor (hrER α)

11. La concentración del receptor activo varía ligeramente en función del lote y de las condiciones de conservación. Por este motivo, debe determinarse la concentración del receptor activo tal como se recibe del proveedor. Esto dará la concentración adecuada del receptor activo en el momento de realizar la tanda.
12. En condiciones correspondientes a la unión de competencia (es decir, [^3H]-estradiol 1 nM), deben incubarse concentraciones nominales del receptor de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 nM en ausencia (unión total) y presencia (unión inespecífica) de estradiol no marcado 1 μM . La unión específica, calculada como la diferencia de unión total e inespecífica, se representa frente a la concentración nominal del receptor. La concentración del receptor que da valores de unión específica correspondientes al 20 % de la sustancia radiomarcada añadida está relacionada con la correspondiente concentración nominal del receptor, y esta concentración del receptor debe utilizarse para los experimentos de unión de saturación y de competencia. Con frecuencia, una concentración final del rhER de 0,5 nM cumplirá esta condición.
13. Si el criterio del 20 % no puede cumplirse de forma reiterada, deberá comprobarse si no se encuentran posibles errores en la configuración experimental. Si no se cumple el criterio del 20 %, puede deberse a que en el lote del recombinante hay muy poco de receptor activo, y en tal caso debe considerarse el uso de otro lote del receptor.

Ensayo de saturación

14. Deben evaluarse por triplicado ocho concentraciones cada vez mayores de [^3H]17 β -estradiol, en las tres condiciones siguientes (véase el cuadro 2):
 - En ausencia de 17 β -estradiol no marcado y presencia de ER. Se trata de la determinación de la unión total por medida de la radiactividad en los pocillos que solo tienen [^3H]17 β -estradiol.
 - En presencia de una concentración de 17- β -estradiol no marcado que supera 1 000 veces la concentración de 17 β -estradiol marcado y en presencia del ER. El propósito de esta condición es saturar los puntos activos de unión con 17 β -estradiol no marcado y, midiendo la radiactividad en los pocillos, determinar la unión inespecífica. Se considera que el eventual estradiol marcado restante que pueda unirse al receptor se une a un punto de unión inespecífica, ya que el estradiol no marcado debe estar a una concentración tan elevada que esté unido a todos los puntos específicos disponibles del receptor.
 - En ausencia de 17 β -estradiol no marcado y ausencia de ER (determinación de la radiactividad total).

Preparación de soluciones de [^3H]17 β -estradiol y de 17 β -estradiol no marcado

15. Deben prepararse diluciones de [^3H]17 β -estradiol añadiendo solución amortiguadora de ensayo a una solución madre 12 nM de [^3H]17 β -estradiol para obtener concentraciones

inicialmente en el intervalo de 0,12 nM a 12 nM. Mediante la adición de 40 µl de estas soluciones a los pocillos de ensayo correspondientes de una placa de microvaloración de 96 pocillos (en un volumen final de 160 µl), se obtendrán las concentraciones finales de ensayo, entre 0,03 y 3,0 nM. La preparación de la solución amortiguadora de ensayo y de la solución madre de [³H]17β-estradiol y sus diluciones, así como la determinación de las concentraciones, se describen con detalle en el protocolo FW (2).

16. Las diluciones de las soluciones etanólicas de 17β-estradiol deben prepararse añadiendo solución amortiguadora de ensayo para conseguir ocho concentraciones cada vez mayores que inicialmente van de 0,06 µM a 6 µM. Mediante la adición de 80 µl de estas soluciones a los pocillos de ensayo correspondientes de una placa de microvaloración de 96 pocillos (en un volumen final de 160 µl), se obtendrán las concentraciones finales de ensayo, que van de 0,03 µM hasta 3 µM. La concentración final de 17β-estradiol no marcado en los distintos pocillos de unión inespecífica debe ser 1 000 veces superior a la concentración de [³H]17β-estradiol marcado. La preparación de diluciones de 17β-estradiol no marcado se describe en profundidad en el protocolo FW (2).
17. Debe utilizarse la concentración nominal del receptor que da una unión específica del $20 \pm 5 \%$ (véanse los puntos 12-13). La solución de hrERα debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.
18. Las placas de microvaloración de 96 pocillos se preparan como se ilustra en el cuadro 2, con 3 réplicas por concentración. En el apéndice 2.2 figura un ejemplo de asignación a las placas de concentraciones y volúmenes de [³H]17β-estradiol, de 17β-estradiol no marcado, de solución amortiguadora y de receptor.

Cuadro 2: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Unión total (disolvente)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
<i>C</i>													
<i>D</i>	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H]E2 + E2 0,10 μM			Unión inespecífica
<i>E</i>	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER + + 3,0 μM E2			
<i>F</i>													
<i>G</i>													
<i>H</i>													

[³H]E2: [³H]17β-Estradiol.

ER: Receptor estrogénico.

E2: 17 β -Estradiol no marcado.

19. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a una temperatura de entre 2 ° y 8 °C durante entre 16 y 20 horas y colocarse en un rotador durante el período de incubación.

Medición del [³H]17 β -estradiol unido al hrER α

20. El [³H]17 β -estradiol unido al hrER α debe separarse del [³H]17 β -estradiol libre mediante la adición a cada pocillo de 80 μ l de suspensión fría de DCC, seguida de agitación de las placas de microvaloración durante 10 minutos y de centrifugación durante 10 minutos a unas 2 500 rpm. Para reducir al mínimo la disociación de [³H]17 β -estradiol unido al hrER α durante este proceso, es sumamente importante que la temperatura de las soluciones amortiguadoras y de los pocillos del ensayo se mantenga entre 2 y 8 °C, y que cada paso se lleve a cabo con rapidez. Para tratar las placas de forma eficiente y rápida se necesita un agitador de placas de microvaloración.
21. A continuación, se deben tomar 50 μ l del sobrenadante que contiene el [³H]17 β -estradiol unido al hrER α con muchísimo cuidado para evitar cualquier contaminación de los pocillos por contacto con la suspensión de DCC, y deben colocarse en una segunda placa de microvaloración.
22. A continuación, deben añadirse a cada pocillo (A1-B12 y D1 a E12) 200 μ l del líquido de centelleo, capaces de convertir la energía cinética de las emisiones nucleares en energía luminosa. Los pocillos G1-H12 (identificados como dpm totales) contienen diluciones seriadas del [³H]17 β -estradiol (40 μ l) que deben ponerse directamente en el líquido de centelleo de los pocillos de la placa de medición, como se indica en el cuadro 3; es decir, estos pocillos contienen solo 200 μ l del líquido de centelleo y la dilución adecuada del [³H]17 β -estradiol. Estas medidas muestran cuánto [³H]17 β -estradiol medido en dpm se había añadido a cada conjunto de pocillos en relación con la unión total y con la unión inespecífica.

Cuadro 3: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación, medición de la radiactividad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Unión total (disolvente)
B	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Unión inespecífica
E	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER + + 3,0 μM E2			
F													

G	0,03 nM [³ H]E2 (dpm totales)	0,06 nM [³ H]E2	0,08 nM [³ H]E2	0,10 nM [³ H]E2	dpm totales*
H	0,30 nM [³ H]E2	0,60 nM [³ H]E2	1,0 nM [³ H]E2	3,0 nM [³ H]E2	

[³H]E2: [³H]17β-estradiol.

ER: Receptor estrogénico.

E2: 17β-Estradiol no marcado.

dpm: Desintegraciones por minuto.

* Las diluciones en serie de estradiol marcado con [³H] deben añadirse directamente a 200 µl de líquido de centelleo en los pocillos G1 - H12.

23. La medición debe comenzar cuando hayan pasado al menos 2 horas y el tiempo de recuento debe ser de 40 minutos por pocillo. Para la determinación de las dpm/pocillo con corrección de la atenuación debe utilizarse un contador de centelleo para placas de microvaloración. Si no se dispone de este contador de centelleo para placas de microvaloración, se puede recurrir también a medir las muestras con un contador convencional. En estas condiciones, puede considerarse una reducción del tiempo de recuento.

Ensayo de unión de competencia

24. El ensayo de unión de competencia mide la unión de una única concentración de [³H]17β-estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Deben utilizarse en paralelo tres réplicas de cada concentración en cada tanda. Además, deben realizarse tres tandas no simultáneas con cada producto problema. El ensayo debe configurarse en una o más placas de microvaloración con 96 pocillos.

Testigos

25. Al realizar el ensayo, deben incluirse en cada experimento testigos y disolventes en paralelo (es decir, estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: i) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y una media (aproximadamente la CI₅₀) tanto de E2 como del ligando débil, por triplicado; ii) el testigo de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por triplicado. En la referencia 2 (anexo K, protocolo del ensayo FW) se describen los procedimientos para la preparación de las soluciones amortiguadoras, testigo, de [³H]17β-estradiol, de hrERα y de producto problema.

Control del disolvente:

26. El control del disolvente indica que este no interactúa con el sistema de ensayo y que también mide la unión total (*total binding*, TB). El etanol es el disolvente preferido. Si la concentración más alta del producto problema no es soluble en etanol, también se podrá

utilizar DMSO. La concentración de etanol o DMSO, si se utiliza este, en los pocillos del ensayo final es del 1,5 % y no puede ser superior al 2 %.

Testigo de la solución amortiguadora:

27. El testigo de la solución amortiguadora (*buffer control*, BC) no debe contener ni disolvente ni producto problema, pero sí todos los demás componentes del ensayo. Los resultados del testigo de la solución amortiguadora se comparan con el control del disolvente para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo.

Ligando fuerte (estrógeno de referencia)

28. El 17 β -estradiol (n.º CAS 50-28-2) es el ligando endógeno y se une con gran afinidad al ER, subtipo alfa. Debe prepararse una curva patrón con 17 β -estradiol no marcado para cada uno de los ensayos de unión de competencia al hrER α , a fin de permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo dentro del mismo laboratorio. Deben prepararse en etanol ocho soluciones de 17 β -estradiol no marcado, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 100 nM y 10 pM [-7 (log M) hasta -11 (log M)], separadas como sigue: -7 (log M), -8 (log M), -8,5 (log M), -9 (log M), -9,5 (log M), -10 (log M), -11 (logM). La concentración más elevada de 17 β -estradiol no marcado (1 μ M) también sirve de indicador de unión inespecífica. Esta concentración se distingue con el rótulo «NSB» (*non-specific binding*) en el cuadro 4, aunque también forma parte de la curva patrón.

Ligando débil

29. Debe incluirse un ligando débil [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) o noretindrona (n.º CAS 68-22-4)] para demostrar la sensibilidad de cada experimento y permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo. Deben prepararse en etanol ocho soluciones del ligando débil, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 3 nM y 30 μ M [desde -8,5 (log M) hasta -4,5 (log M)], separadas como sigue: [-4,5 (log M), -5 (log M), -5,5 (log M), -6 (log M), -9,5 (log M), -7,5 (log M), -8,5 (logM)].

No ligando

30. Debe utilizarse como testigo negativo (no ligando) el octiltriethoxisilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1). Aporta la garantía de que el ensayo, tal como se realiza, detecta si los productos problema no se unen al hrER α . Deben prepararse en etanol ocho soluciones del no ligando, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 0,1 nM y 1 000 μ M [desde -10 (log M) hasta -3 (log M)], con incrementos logarítmicos. Puede utilizarse también como no ligando testigo el ftalato de di-n-butilo (DBP). Se ha visto que su solubilidad máxima es de -4 (log M).

Concentración del hrER α

31. Debe utilizarse la cantidad del receptor que da una unión específica del $20 \pm 5 \%$ de radioligando 1 nM (véanse los puntos 12-13 del apéndice 2). La solución de hrER α debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.

[³H]17 β -estradiol

32. La concentración de [³H]17 β -estradiol en los pocillos de ensayo debe ser de 1,0 nM.

Productos problema

33. En primer lugar, es necesario realizar un ensayo de solubilidad para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al aplicar el protocolo del ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y se confirma después en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no deberá ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un testigo de disolvente, junto con ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, sobre la base del límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado (véase el punto 35). El producto problema debe ensayarse utilizando curvas con ocho concentraciones a intervalos logarítmicos, definidas en el ensayo previo de detección del intervalo de concentraciones. Las concentraciones en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta.
34. Las diluciones del producto problema deben prepararse en el disolvente adecuado (véase el punto 26 del apéndice 2). Si la concentración más elevada del producto problema no fuera soluble en etanol o DMSO, y la adición de más disolvente hiciera que la concentración de disolvente en el tubo final fuera mayor que el límite aceptable, la concentración más elevada podría reducirse a la concentración inmediatamente inferior. En este caso, podría añadirse una concentración adicional en el extremo inferior de la serie de concentraciones. Las demás concentraciones de la serie deben permanecer inalteradas.
35. Las soluciones del producto problema deben ser objeto de un estrecho seguimiento cuando se añaden al pocillo del ensayo, ya que el producto problema puede provocar una precipitación cuando se añade al pocillo del ensayo. Los datos de todos los pocillos que contengan precipitado deben quedar excluidos del ajuste de la curva, y debe anotarse el motivo de la exclusión de los datos.
36. Si hay información previa de otras fuentes que proporcionen el log CI₅₀ de un producto problema, puede ser adecuado espaciar geométricamente las diluciones (es decir, 0,5 unidades logarítmicas alrededor del log CI₅₀ previsto. El resultado final debe reflejar la suficiente amplitud de las concentraciones a ambos lados del log CI₅₀, incluidos la “parte superior” y la “parte inferior”, de manera que la curva de la unión pueda caracterizarse adecuadamente.

Organización de las placas del ensayo

37. Deben prepararse placas de microvaloración etiquetadas que tengan en cuenta las incubaciones séxtuples con códigos para el control del disolvente, la concentración más elevada del estrógeno de referencia, que también sirve de indicador de la unión inespecífica (NSB), y el testigo de la solución amortiguadora, y que tengan en cuenta las incubaciones por triplicado con códigos para cada una de las ocho concentraciones del testigo no ligando (octiltrietoxisilano), las siete concentraciones inferiores del estrógeno de referencia, las ocho concentraciones del ligando débil y las ocho concentraciones de cada producto problema (*test chemical*, TC). En el cuadro 4 a continuación figura un ejemplo de diagrama de la disposición de la placa para las curvas de concentración completas correspondientes al estrógeno de referencia y al testigo. Se utilizan placas de microvaloración adicionales para los productos problema y deben incluir testigos de las placas, es decir: 1) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y media (aproximadamente la CI_{50}) tanto del E2 como de un ligando débil, por triplicado; 2) el testigo de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por sextuplicado (cuadro 5). En el apéndice 2.3 se presenta un ejemplo de hoja de cálculo de la configuración de la placa de microvaloración para el ensayo de competencia con tres productos problema desconocidos. Las concentraciones indicadas en los cuadros 4 y 5 son las concentraciones finales del ensayo. La concentración máxima de E2 debe ser 1×10^{-7} M y la del ligando débil debe ser la concentración más elevada utilizada para este en la placa 1. La concentración CI_{50} debe ser determinada por el laboratorio a partir de su base de datos de testigos históricos. Se espera que este valor sea similar al observado en los estudios de validación (véase el cuadro 1).

Cuadro 4: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, curvas completas de concentración del estrógeno de referencia y de los testigos (placa 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (solo disolvente)			TB (solo disolvente)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8.5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9.5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blanco*		
D	NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5.5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6.5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7.5}$)			NE ($1 \times 10^{-8.5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blanco (de marcado)**			Blanco (de marcado)**			Testigo de la solución amortiguadora			Testigo de la solución amortiguadora		

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

* Blanco real, pocillo no utilizado.

** Blanco no utilizado durante la incubación, pero sí utilizado para confirmar la radiactividad total añadida.

Cuadro 5: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, curvas completas de concentración de los productos problema y de los testigos de las placas.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>	TB (solo disolvente)			TB (solo disolvente)			NSB			NSB		
<i>B</i>	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
<i>C</i>	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
<i>D</i>	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
<i>E</i>	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
<i>F</i>	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
<i>G</i>	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
<i>H</i>	NE (CI ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			E2 (CI ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

Terminación del ensayo de unión de competencia

38. Como se muestra en el cuadro 6, deben añadirse a los pocillos 80 µl del testigo de disolvente, del testigo de la solución amortiguadora, del estrógeno de referencia, del ligando débil, del no ligando y de los productos problema preparados en la solución amortiguadora de ensayo. A continuación, deben añadirse a cada pocillo 40 µl de una solución 4 nM de [³H]17β-estradiol. Tras una rotación suave durante entre 10 y 15 minutos, a una temperatura de entre 2 ° y 8 °C, deben añadirse 40 µl de solución de hrERα. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a una temperatura de entre 2 ° y 8 °C durante entre 16 y 20 horas y colocarse en un rotador durante el período de incubación.

Cuadro 6: Volumen de los componentes del ensayo para las placas de un ensayo de unión de competencia, placas de microvaloración.

Volumen (µl)	Componente
80	17β-Estradiol no marcado, noretinodrel, OTES, productos problema, disolvente o solución amortiguadora
40	Solución 4 nM de [³ H]17β-estradiol
40	Solución de hrERα, concentración según se haya determinado
160	<i>Volumen total en cada pocillo del ensayo</i>

39. A continuación debe llevarse a cabo la cuantificación del [³H]17β-estradiol unido al hrERα, tras la separación del [³H]17β-estradiol unido al hrERα respecto al [³H]17β-estradiol libre mediante la adición de 80 µl de suspensión fría de DCC a cada pocillo, como se describe en los puntos 20 a 23, para el ensayo de unión de saturación.

40. Los pocillos H1-6 [identificados como blanco (de marcado) en el cuadro 4] presentan las dpm del estradiol marcado con [^3H] en 40 μl . La alícuota de 40 μl debe añadirse directamente al líquido de centelleo en los pocillos H1 - H6.

Criterios de aceptabilidad

Ensayo de unión de saturación

41. La curva de unión específica debe alcanzar una meseta a medida que se utilizan concentraciones crecientes de [^3H]17 β -estradiol, lo que indica la saturación del hrER α con el ligando.
42. La unión específica a la concentración 1 nM de [^3H]17 β -estradiol debe situarse en el intervalo aceptable del 15 % - 25 % de la radiactividad total medida media que se ha añadido en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas y repetirse el ensayo de saturación.
43. Los datos deben corresponder a una gráfica lineal de Scatchard.
44. La unión inespecífica no debe ser excesiva. El valor de la unión inespecífica debe ser típicamente < 35 % de la unión total. Sin embargo, la proporción puede superar ocasionalmente este límite cuando se miden valores muy bajos de dpm con la concentración más baja de 17 β -estradiol radiomarcado.

Ensayo de unión de competencia

45. El aumento de las concentraciones de 17 β -estradiol no marcado debe desplazar el [^3H]17 β -estradiol del receptor de manera coherente con una unión de competencia a un solo punto.
46. El valor de CI_{50} para el estrógeno de referencia (es decir, el 17 β -estradiol) debe ser aproximadamente igual a la concentración molar del [^3H]17 β -estradiol más la K_d determinada a partir del ensayo de unión de saturación.
47. La unión específica total debe estar sistemáticamente dentro del intervalo aceptable del 20 ± 5 % cuando la concentración medida media de la radiactividad total añadida a cada pocillo es de 1 nM en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas.
48. El disolvente no debe alterar la sensibilidad ni la reproducibilidad del ensayo. Los resultados del control del disolvente (pocillos TB) se comparan con el testigo de la solución amortiguadora para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo. Los resultados del testigo de la TB y de la solución amortiguadora deben ser comparables si el disolvente no produce ningún efecto sobre el ensayo.

49. El no ligando no debe desplazar más del 25 % del [^3H]17 β -estradiol del hrER α cuando se somete a ensayo hasta la concentración de 10^{-3} M (OTES) o 10^{-4} M (DBP).
50. Se han establecido criterios de comportamiento para el estrógeno de referencia y dos ligandos débiles (por ejemplo, noretinodrel, noretindrona) utilizando los datos del estudio de validación del ensayo de FW de unión al hrER (anexo N de la referencia 2). Se aportan los intervalos de confianza del 95 % para la media (n) $\pm$ DT de todas las tandas de los testigos en todos los laboratorios participantes en el estudio de validación. Se calcularon intervalos de confianza del 95 % para los parámetros de ajuste de las curvas (es decir, parte superior, parte inferior, pendiente de Hill, log CI_{50}) en relación con el estrógeno de referencia y los ligandos débiles, y para el log $_{10}$ RBA de los ligandos débiles en relación con el estrógeno de referencia, y se proporcionan como criterios de comportamiento respecto a los testigos positivos. En el cuadro 1 se ofrecen los intervalos previstos para los parámetros de ajuste de las curvas, que pueden utilizarse como criterios de comportamiento. En la práctica, el intervalo de la CI_{50} puede variar ligeramente según la K_d del preparado del receptor y la concentración del ligando.
51. No se han establecido criterios de comportamiento sobre los parámetros de ajuste de las curvas en relación con los productos problema debido a la amplia gama de productos problema que puede haber y a la variación de las posibles afinidades y resultados (por ejemplo, ajuste de la curva completa o de la curva parcial, o sin ajuste alguno). Sin embargo, a la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional. Debe utilizarse un intervalo suficiente de concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior (p. ej., 90 - 100 % de unión) de la curva de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas en momentos diferentes, debe ser razonable y científicamente justificable. Los testigos de cada tanda de un producto problema deben aproximarse a las medidas de comportamiento notificadas para este ensayo de FW y deben ser coherentes con los datos históricos de los testigos de cada laboratorio respectivo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Ensayo de unión de saturación

52. Se mide tanto la unión total como la inespecífica. A partir de estos valores, se calcula la unión específica con concentraciones en aumento de [^3H]17 β -estradiol en condiciones de equilibrio, restando la inespecífica de la total. La gráfica de la unión específica frente a la concentración de [^3H]17 β -estradiol debe alcanzar una meseta para la unión específica máxima, lo cual indica la saturación del hrER α con el [^3H]17 β -estradiol. Por otra parte, el análisis de los datos debe documentar la unión del [^3H]17 β -estradiol a un solo punto de unión de elevada afinidad. En la curva de unión de saturación deben ponerse de manifiesto la unión inespecífica, la total y la específica. El posterior análisis de estos datos debe

utilizar una regresión no lineal (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) con una representación final de los datos como gráfica de Scatchard.

53. El análisis de los datos debe determinar los parámetros B_{max} y K_d a partir solo de los datos de unión total, aceptando que la unión inespecífica es lineal, salvo que se justifique utilizar otro método. Además, a la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. Al determinar los parámetros B_{max} y K_d a partir de los datos de la unión de saturación, siempre debe aplicarse una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos (p. ej., utilizando el método de Swillens, 1995).

Ensayo de unión de competencia

54. La curva de la unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del $[^3H]17\beta$ -estradiol frente a la concentración (unidades $\log_{10}$) del competidor. La concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del $[^3H]17\beta$ -estradiol es el valor de la CI_{50} .
55. Deben estimarse los valores de $\log CI_{50}$ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y $\log CI_{50}$ deben dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. No debe utilizarse ninguna corrección por el agotamiento de los ligandos. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil debe calcularse como porcentaje del $\log CI_{50}$ del ligando débil respecto al $\log CI_{50}$ del 17β -estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando las medidas del comportamiento del ensayo de los puntos 45 - 50 del presente apéndice 2.
56. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de unión de competencia se clasifica correctamente. Se recomienda que cada tanda con el producto problema se someta inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles (véase el punto 55 anterior). Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de las curvas, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de $[^3H]17\beta$ -estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto, y la de la

coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente.

Interpretación de los datos

57. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es un ligando del hrER α si puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de los datos es inferior al 50 % (figura 1).

58. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es no ligando del hrER α si:

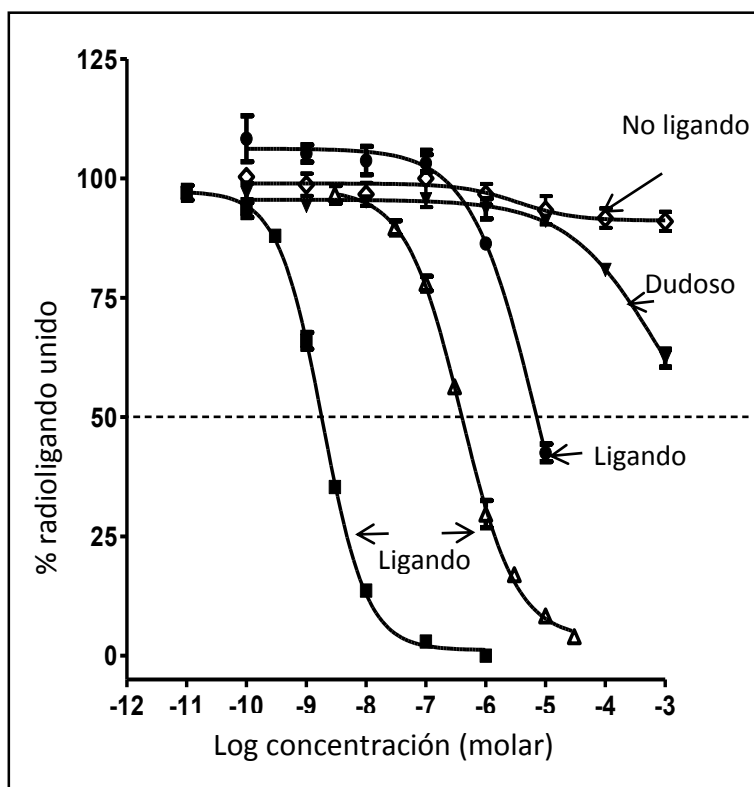
- puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %, o
- no puede ajustarse una curva de unión y la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %.

59. Los productos problema se consideran dudosos si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores (por ejemplo, el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

Cuadro 7: Criterios de asignación de la clasificación a un producto problema sobre la base de una curva de unión de competencia.

Clasificación	Criterios
Ligando ^a	Puede ajustarse una curva de unión. El punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de datos es inferior al 50 % .
No ligando ^b	Si puede ajustarse una curva de unión, el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 % . Si no puede ajustarse una curva de unión, la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 % .
Dudoso ^c	Cualquier producto sometido al ensayo que no sea ni ligando ni no ligando (p. ej., el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

Figura 1: Ejemplos de clasificación de productos problema utilizando una curva de unión de competencia.



60. Se combinan las diversas tandas realizadas con un producto problema dentro de un laboratorio, asignando un valor numérico a cada tanda y promediando entre ellas, como se muestra en el cuadro 8. Los resultados de las tandas combinadas dentro de cada laboratorio se comparan con la clasificación prevista de cada producto problema.

Cuadro 8: Método de clasificación del producto problema mediante varias tandas dentro de un laboratorio

Asignar valor a cada tanda:	
Clasificación	Valor numérico
Ligando	2
Dudoso	1
No ligando	0
Clasificar según la media de los valores numéricos de las tandas:	
Clasificación	Valor numérico
Ligando	Media $\geq 1,5$
Dudoso	$0,5 \leq \text{Media} < 1,5$
No ligando	Media $< 0,5$

INFORME DEL ENSAYO

61. Véase el punto 24 de la sección **“COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER”** de este método de ensayo.

Apéndice 2.1

RELACIÓN DE TÉRMINOS

[³H]E2: 17 β -Estradiol radiomarcado con tritio.

DCC: Carbón recubierto de dextrano.

E2: 17 β -Estradiol no marcado (inerte).

Solución amortiguadora del ensayo: Tris 10 mM, 10 mg de seroalbúmina bovina / ml, DTT 2 mM, glicerol al 10%, leupeptina 0,2 mM, pH 7,5.

hrER α : Receptor estrogénico recombinante humano alfa.

Réplica: Cada uno de los diversos pocillos que tienen el mismo contenido a la misma concentración y se someten a ensayo simultáneamente dentro de una misma tanda. En este protocolo, cada concentración del producto problema se somete al ensayo por triplicado; es decir, hay tres réplicas que se someten simultáneamente al ensayo con cada concentración del producto problema.

Tanda: Conjunto completo de pocillos de ensayo en placas de microvaloración sometidos a ensayo a la vez, que aporta toda la información necesaria para caracterizar la unión de un producto problema al hrER α (a saber, [³H]17 β -estradiol total añadido al pocillo de ensayo, unión máxima del [³H]17 β -estradiol al hrER α , unión inespecífica, y unión total a diversas concentraciones del producto problema). Una tanda podría consistir simplemente en un solo pocillo (es decir, una réplica) por concentración, pero, puesto que este protocolo requiere que los ensayos se realicen por triplicado, una tanda estará compuesta por tres pocillos de ensayo por cada concentración. Además, este protocolo exige la realización de tres tandas independientes (es decir, no simultáneas) por producto.

Apéndice 2.2

ENSAYO NORMAL DE SATURACIÓN CON [³H]17B-ESTRADIOL CON TRES POCILLOS REPLICADOS

Ensayo normal de saturación con [³ H]17β-estradiol con tres pocillos replicados											
Posición	Réplica	Código de tipo de pocillo	Concentración inicial de E2 marcado (nM)	Volumen de E2 marcado (μl)	Concentración final de E2 marcado (nM)	Concentración inicial de E2 no marcado (μM)	Volumen de E2 no marcado (μl)	Concentración final de E2 no marcado (μM)	Volumen de solución amortiguadora (μl)	Volumen de receptor (μl)	Volumen total en los pocillos
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160

Ensayo normal de saturación con [3H]17β-estradiol con tres pocillos replicados											
Posición	Réplica	Código de tipo de pocillo	Concentración inicial de E2 marcado (nM)	Volumen de E2 marcado (μl)	Concentración final de E2 marcado (nM)	Concentración inicial de E2 no marcado (μM)	Volumen de E2 no marcado (μl)	Concentración final de E2 no marcado (μM)	Volumen de solución amortiguadora (μl)	Volumen de receptor (μl)	Volumen total en los pocillos
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Marcado	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Marcado	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Marcado	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Marcado	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Marcado	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Marcado	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Marcado	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Marcado	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Marcado	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Marcado	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Marcado	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Marcado	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Marcado	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Marcado	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Marcado	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Marcado	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Marcado	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Marcado	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Marcado	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Marcado	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Marcado	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Marcado	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Marcado	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Marcado	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Obsérvese que los pocillos “marcados” están vacíos durante la incubación. Los 40 μl se añaden solo para el recuento de centelleo.

Apéndice 2.3: Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia

Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (μl)	Volumen de solución amortiguadora (μl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (μl)	Volumen tomado de la placa de dilución (μL)	Volumen final (μl)	Concentración final del competidor (M)
S	A1	1	Unión total	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	Unión total	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	Unión total	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	Unión total	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	Unión total	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	Unión total	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 no marcado	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 no marcado	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 no marcado	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 no marcado	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 no marcado	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	E2 no marcado	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 no marcado	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 no marcado	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 no marcado	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 no marcado	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	E2 no marcado	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 no marcado	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 no marcado	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 no marcado	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 no marcado	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 no marcado	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 no marcado	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 no marcado	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 no marcado	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 no marcado	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 no marcado	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	E2 no marcado	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Blanco	Blanco	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	Blanco	Blanco	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	Blanco	Blanco	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (μl)	Volumen de solución amortiguadora (μl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (μl)	Volumen tomado de la placa de dilución (μL)	Volumen final (μl)	Concentración final del competidor (M)
S	E1	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	Marcado	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	Testi sol. amortig.	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Obsérvese que los pocillos “marcados” están vacíos durante la incubación. Los 40 μl se añaden solo para el recuento de centelleo.

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (µl)	Volumen de solución amortiguadora (µl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (µl)	Volumen tomado de la placa de dilución (µl)	Volumen final (µl)	Concentración final del competidor (M)
P1	A1	1	Unión total	TB	TBB1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	Unión total	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	Unión total	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	Unión total	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	Unión total	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	Unión total	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1A10	1	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1A11	2	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1A12	3	E2 no marcado (elevada)	NSB	S0	2,00E-	40	-	40	80	160	1,0E-06	
P1	B1	1	Producto problema 1	TC1	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Producto problema 1	TC1	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Producto problema 1	TC1	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Producto problema 1	TC1	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Producto problema 1	TC1	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Producto problema 1	TC1	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Producto problema 1	TC1	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Producto problema 1	TC1	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Producto problema 1	TC1	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1B10	1	Producto problema 1	TC1	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1B11	2	Producto problema 1	TC1	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1B12	3	Producto problema 1	TC1	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	C1	1	Producto problema 1	TC1	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Producto problema 1	TC1	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Producto problema 1	TC1	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Producto problema 1	TC1	6	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Producto problema 1	TC1	6	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Producto problema 1	TC1	6	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Producto problema 1	TC1	7	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Producto problema 1	TC1	7	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Producto problema 1	TC1	7	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1C10	1	Producto problema 1	TC1	8	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1C11	2	Producto problema 1	TC1	8	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1C12	3	Producto problema 1	TC1	8	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-10	
P1	D1	1	Producto problema 2	TC2	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Producto problema 2	TC2	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Producto problema 2	TC2	1	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Producto problema 2	TC2	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Producto problema 2	TC2	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Producto problema 2	TC2	2	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Producto problema 2	TC2	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Producto problema 2	TC2	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Producto problema 2	TC2	3	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1D10	1	Producto problema 2	TC2	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1D11	2	Producto problema 2	TC2	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1D12	3	Producto problema 2	TC2	4	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-06	
P1	E1	1	Producto problema 2	TC2	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Producto problema 2	TC2	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Producto problema 2	TC2	5	2,00E-	40	0	40	80	160	1,0E-07

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (µl)	Volumen de solución amortiguadora (µl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (µl)	Volumen tomado de la placa de dilución (µl)	Volumen final (µl)	Concentración final del competidor (M)
P1	E4	1	Producto problema	2TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Producto problema	2TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Producto problema	2TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Producto problema	2TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Producto problema	2TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Producto problema	2TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1E10	1	Producto problema	2TC2	8	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1E11	2	Producto problema	2TC2	8	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1E12	3	Producto problema	2TC2	8	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Producto problema	3TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Producto problema	3TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Producto problema	3TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Producto problema	3TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Producto problema	3TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Producto problema	3TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Producto problema	3TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Producto problema	3TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Producto problema	3TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1F10	1	Producto problema	3TC3	4	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1F11	2	Producto problema	3TC3	4	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1F12	3	Producto problema	3TC3	4	2,00E-06	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	Producto problema	3TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Producto problema	3TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Producto problema	3TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Producto problema	3TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Producto problema	3TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Producto problema	3TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Producto problema	3TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Producto problema	3TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Producto problema	3TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1G10	1	Producto problema	3TC3	8	2,00E-10	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1G11	2	Producto problema	3TC3	8	2,00E-10	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1G12	3	Producto problema	3TC3	8	2,00E-10	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 no marcado S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 no marcado S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 no marcado S			IC50	40	0	40	80	160	
P1H10	1	E2 no marcado S				1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1H11	2	E2 no marcado S				1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1H12	3	E2 no marcado S				1,00E-7	40	0	40	80	160	

Apéndice 3

ENSAYO *IN VITRO* DEL INSTITUTO DE EVALUACIÓN E INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS (CERI) DE UNIÓN AL RECEPTOR ESTROGÉNICO CON UTILIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA CON UN DOMINIO DE UNIÓN AL LIGANDO DEL ERA RECOMBINANTE HUMANO

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de unión al receptor estrogénico (ER α) de saturación y de competencia *in vitro* utiliza un dominio de unión al ligando (*ligand binding domain*, LBD) del receptor ER α humano (hrER α). Esta construcción proteínica fue producida por el Instituto de Evaluación e Investigación de Productos Químicos de Japón (Chemicals Evaluation Research Institute, CERI), existe como proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) y se expresa en *E. coli*. El protocolo del CERI fue sometido a un estudio de validación internacional multilaboratorios (2), que demostró su pertinencia y fiabilidad para la finalidad prevista del ensayo.
2. Este ensayo es un procedimiento de cribado para identificar sustancias que pueden unirse al hrER α . Se utiliza para determinar la capacidad de un producto problema de competir con el 17 β -estradiol para unirse al LBD del hrER α . Los resultados cuantitativos del ensayo pueden incluir la CI₅₀ (medida de la concentración del producto problema necesaria para desplazar la mitad del [³H]17 β -estradiol del hrER α) y las afinidades relativas de unión de los productos problema respecto al hrER α en comparación con el 17 β -estradiol. A efectos de cribado de los productos problema, entre los resultados cualitativos aceptables de los ensayos pueden incluirse la clasificación de los productos problema como ligandos o no ligandos del hrER α , o bien si el resultado es dudoso sobre la base de los criterios descritos para las curvas de unión.
3. El ensayo utiliza un ligando radiactivo, lo que impone al laboratorio la obligación de disponer de una licencia de materiales radiactivos. Todos los procedimientos con radioisótopos y productos peligrosos deben ajustarse a las normas y procedimientos descritos en la legislación nacional.
4. Las secciones “**INTRODUCCIÓN GENERAL**” y “**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER**” deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El ensayo de unión al hrER α mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([³H]17 β -estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que

presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor.

6. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando, seguido de un experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.
7. El objetivo del experimento de unión de saturación es caracterizar un determinado lote de receptores en cuanto a su afinidad de unión y número para preparar el experimento de unión de competencia. El experimento de unión de saturación mide, en condiciones de equilibrio, la afinidad de una concentración fija del receptor estrogénico por su ligando natural (representada por la constante de disociación, K_d) y la concentración de puntos activos de unión de los receptores (B_{max}).
8. El experimento de unión de competencia mide la afinidad de una sustancia para competir con el $[^3H]17\beta$ -estradiol en cuanto a la unión al ER. La afinidad se cuantifica por la concentración del producto problema que, en equilibrio, inhibe el 50 % de la unión específica del $[^3H]17\beta$ -estradiol (denominada "concentración inhibitoria del 50 %" o CI_{50}). También puede evaluarse utilizando la afinidad relativa de unión (RBA, en relación con la CI_{50} del estradiol medida aparte en la misma tanda). El experimento de unión de competencia mide la unión del $[^3H]17\beta$ -estradiol a una concentración fija en presencia de una amplia gama de concentraciones (ocho órdenes de magnitud) del producto problema. A continuación, se ajustan los datos, en la medida de lo posible, a una forma de la ecuación de Hill (Hill, 1910) que describe el desplazamiento del radioligando por un ligando competitivo de un solo punto de unión. La magnitud del desplazamiento del estradiol radiomarcado en equilibrio se utiliza para caracterizar el producto problema como ligando, no ligando, o generador de una respuesta dudosa.

PROCEDIMIENTO

Demostración del comportamiento aceptable de la proteína del hrER α

9. Con anterioridad a la realización sistemática de los ensayos de unión de saturación y de competencia, se debe demostrar que cada nuevo lote de hrER α presenta un comportamiento correcto en el laboratorio en el que se va a utilizar. Para demostrar el comportamiento debe seguirse un proceso de dos fases. Se trata de las siguientes:
 - Realizar un ensayo de unión de $[^3H]17\beta$ -estradiol de saturación para demostrar la especificidad y saturación del hrER α . El análisis no lineal de regresión de estos datos (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) y la consiguiente gráfica de Scatchard deben documentar la afinidad de unión al hrER α del $[^3H]17\beta$ -estradiol (K_d) y el número de receptores (B_{max}) respecto a cada lote del hrER α .

- Llevar a cabo un ensayo de unión de competencia utilizando las sustancias testigo [estrógeno de referencia (17β -estradiol)], un ligando débil (por ejemplo, noretinodrel o noretindrona), y un no ligando (octiltrietoxisilano, OTES). Cada laboratorio debe establecer una base de datos históricos para documentar la coherencia de la CI_{50} y de los valores pertinentes sobre el estrógeno de referencia y el ligando débil entre experimentos y diferentes lotes de hrER α . Además, los parámetros de las curvas de unión de competencia de las sustancias testigo deben estar dentro de los límites del intervalo de confianza del 95 % (véase el cuadro 1) que se han establecido utilizando datos de los laboratorios que participaron en el estudio de validación de este ensayo (2).

Cuadro 1: Criterios de comportamiento establecidos para el estrógeno de referencia y el ligando débil, ensayo del CERI de unión al hrER.

Sustancia	Parámetro	Media ^a	Desviación típica (n)	Intervalos de confianza del 95 % ^b	
				Límite inferior	Límite superior
17β-Estradiol	Parte superior	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Parte inferior	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Pendiente de Hill	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	Log CI ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Parte superior	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Parte inferior	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Pendiente de Hill	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	Log CI ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindrona^c	Parte superior	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Parte inferior	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pendiente de Hill	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	Log CI ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Los valores de la media ± desviación típica (DT) con tamaño de la muestra n se calcularon utilizando estimaciones del ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) con tandas de testigos realizadas en cuatro laboratorios durante el estudio de validación (véase el anexo N de la referencia 2).

^b Los intervalos de confianza del 95 % se proporcionan como guía para los criterios de aceptabilidad.

^c El ensayo de noretindrona era opcional para la subtaska 4 durante el estudio de validación (en la referencia 2, véase la subtaska 4). Así pues, los valores de la media ± DT (n) se calcularon utilizando estimaciones de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) en relación con tandas de control realizadas en dos laboratorios.

El intervalo de la CI₅₀ dependerá de la K_d del preparado del receptor y de la concentración de ligando radiomarcado utilizada en cada laboratorio. Será aceptable un ajuste adecuado del intervalo de la CI₅₀ sobre la base de las condiciones utilizadas para realizar el ensayo.

Demostración del comportamiento del laboratorio

- Véanse los puntos 17 y 18 y el cuadro 2 en la sección “**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER**” de este método de ensayo. Cada ensayo (unión de saturación y de competencia) debe consistir en tres tandas independientes (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y de los reactivos) en días diferentes, y cada tanda debe contener tres réplicas.

Determinación de la concentración del receptor (hrERα)

- La concentración del receptor activo varía ligeramente en función del lote y de las condiciones de conservación. Por este motivo, debe determinarse la concentración del receptor activo tal como se recibe del proveedor. Esto dará la concentración adecuada del receptor activo en el momento de la tanda.
- En condiciones correspondientes a la unión de competencia (es decir, [³H]-estradiol 0,5 nM), deben incubarse concentraciones nominales del receptor de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,6 nM

en ausencia (unión total) y presencia (unión inespecífica) de estradiol no marcado 1 μ M. La unión específica, calculada como la diferencia de unión total e inespecífica, se representa frente a la concentración nominal del receptor. La concentración del receptor que da valores de unión específica correspondientes al 40 % de la sustancia radiomarcada añadida está relacionada con la correspondiente concentración del receptor, y esta concentración del receptor debe utilizarse para los experimentos de unión de saturación y de competencia. Con frecuencia, una concentración final del rhER de 0,2 nM cumplirá esta condición.

13. Si el criterio del 40 % no puede cumplirse de forma reiterada, deberá comprobarse si no se encuentran posibles errores en la configuración experimental. Si no se cumple el criterio del 40 %, puede deberse a que en el lote del recombinante hay muy poco de receptor activo, y en tal caso debe considerarse el uso de otro lote del receptor.

Ensayo de saturación

14. Deben evaluarse por triplicado ocho concentraciones cada vez mayores de [^{3} H]17 β -estradiol, en las tres condiciones siguientes (véase el cuadro 2):
- a. En ausencia de 17 β -estradiol no marcado y presencia de ER. Se trata de la determinación de la unión total por medida de la radiactividad en los pocillos que solo tienen [^{3} H]17 β -estradiol.
 - b. En presencia de una concentración de 17- β -estradiol no marcado que supera 2 000 veces la concentración de 17 β -estradiol marcado y en presencia del ER. El propósito de esta condición es saturar los puntos activos de unión con 17 β -estradiol no marcado y, midiendo la radiactividad en los pocillos, determinar la unión inespecífica. Se considera que el eventual estradiol marcado restante que pueda unirse al receptor se une a un punto de unión inespecífica, ya que el estradiol no marcado debe estar a una concentración tan elevada que está unido a todos los puntos específicos disponibles del receptor.
 - c. En ausencia de 17 β -estradiol no marcado y ausencia de ER (determinación de la radiactividad total).

Preparación de las soluciones de [^{3} H]17 β -estradiol, de 17 β -estradiol no marcado y de hrER α

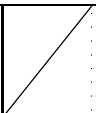
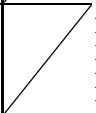
15. Debe prepararse una solución 40 nM de [^{3} H]-17 β -estradiol a partir de una solución madre 1 μ M de [^{3} H]17 β -estradiol en DMSO, mediante la adición de DMSO (para preparar una solución 200 nM) y de solución amortiguadora de ensayo a temperatura ambiente (para preparar la solución 40 nM). Utilizando esta solución 40 nM, se prepara la serie de diluciones de [^{3} H]17 β -estradiol, con concentraciones que van desde 0,313 nM hasta 40 nM con solución amortiguadora de ensayo a temperatura ambiente (representada en la columna 12 del cuadro 2). Las concentraciones finales del ensayo, que van de 0,0313 a 4,0 nM, se obtendrán añadiendo 10 μ l de estas soluciones a los pocillos de ensayo respectivos de una placa de microvaloración de 96 pocillos (véanse los cuadros 2 y 3). La preparación de la solución amortiguadora de ensayo, el cálculo de la solución madre

original de [³H]17β-estradiol sobre la base de su actividad específica, la preparación de las diluciones y la determinación de las concentraciones se describen con detalle en el protocolo del CERI (2).

16. Las diluciones de las soluciones de 17β-estradiol no marcado deben prepararse a partir de una solución madre 1 nM de 17β-estradiol añadiendo solución amortiguadora de ensayo para conseguir ocho concentraciones cada vez mayores que inicialmente van de 0,625 μM a 80 μM. Las concentraciones finales del ensayo, que van de 0,0625 a 8 μM, se obtendrán añadiendo 10 μl de estas soluciones a los pocillos de ensayo respectivos destinados a la medición de la unión inespecífica en una placa de microvaloración de 96 pocillos (véanse los cuadros 2 y 3). La preparación de diluciones de 17β-estradiol no marcado se describe con detalle en el protocolo del CERI (2).
17. Debe utilizarse la concentración del receptor que da una unión específica del 40 ± 10 % (véanse los puntos 12-13). La solución de hrERα debe prepararse con solución amortiguadora enfriada con hielo, justo antes de su utilización, es decir, después de que se hayan preparado todos los pocillos relacionados con la unión total, la unión inespecífica y el ligando marcado solo.
18. Las placas de microvaloración de 96 pocillos se preparan como se ilustra en el cuadro 2, con 3 réplicas por concentración de [³H]17β-estradiol. En el cuadro 3 se indica la asignación de los volúmenes de [³H]17β-estradiol, de 17β-estradiol no marcado, de solución amortiguadora y de receptor.

Cuadro 2: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Para la medición de la TB			Para la medición de la NSB			Para la determinación del ligando marcado solo				Diluciones de E2 no marcado en las columnas 4-6 de la placa	Diluciones de [³ H]E2 en las columnas 1-9 de la placa
A	[³ H]E2 0,0313 nM + ER			[³ H]E2 0,0313 nM + E2 0,0625 μM + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	[³ H]E2 0,0625 nM + ER			[³ H]E2 0,0625 nM + E2 0,125 μM + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	[³ H]E2 0,125 nM + ER			[³ H]E2 0,125 nM + E2 0,25 μM + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	[³ H]E2 0,250 nM + ER			[³ H]E2 0,250 nM + E2 0,5 μM + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	[³ H]E2 0,50 nM + ER			[³ H]E2 0,50 nM + E2 1 μM + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM

F	[³ H]E2 1,00 nM + ER	[³ H]E2 1,00 nM + E2 2 µM + ER	1,00 nM		20 µM	10 nM
G	[³ H]E2 2,00 nM + ER	[³ H]E2 2,00 nM + E2 4 µM + ER	2,00 nM		40 µM	20 nM
H	[³ H]E2 4,00 nM + ER	[³ H]E2 4,00 nM + E2 8 µM + ER	4,00 nM		80 µM	40 nM

TB: unión total.

NSB: unión inespecífica.

[³H]E2: [³H]17β-estradiol.

E2: 17β-estradiol no marcado.

* Las concentraciones aquí indicadas son las concentraciones finales de cada pocillo.

** Las diluciones de E2 no marcado y de [³H]E2 pueden prepararse en una placa diferente.

Cuadro 3: Volúmenes de reactivo para la placa de microvaloración de saturación

Número de columna		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Fases de la preparación		Pocillos TB			Pocillos NSB			Ligando marcado		
Volumen de los componentes de los pocillos de reacción indicados arriba y orden de adición	Solución amortiguadora	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 no marcado de la columna 11 del cuadro 2	-			10 µl			-		
	[³ H]E2 de la columna 12 del cuadro 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volumen total de reacción		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubación		TRAS 2 HORAS DE REACCIÓN EN LA INCUBACIÓN						Cuantificación de la radiactividad justo después de la preparación. Sin incubación.		
Tratamiento con DCC al 0,4 %		Sí			Sí			No		
Volumen de DCC al 0,4 %		100 µl			100 µl			-		
Filtración		Sí			Sí			No		
MEDICIÓN DE LAS DPM										
Volumen de cuantificación añadido a la mezcla de centelleo		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Si se utiliza el LSC para microplacas a fin de medir las dpm, no es adecuado preparar el ligando marcado solo en la misma placa de ensayo que tiene pocillos TB y NSB. El ligando marcado solo debe prepararse en una placa diferente.

** Si se utiliza la centrifugación para separar el DCC, los 50 µl de sobrenadante deben medirse por LSC para evitar la contaminación del DCC.

19. Las placas de microvaloración del ensayo para la determinación de la unión total y de la unión inespecífica deben incubarse a temperatura ambiente (de 22 °C a 28 °C) durante dos horas.

Medición del [³H]17β-estradiol unido al hrERα

20. Tras el período de incubación de dos horas, el [³H]17β-estradiol unido al hrERα debe separarse del [³H]-17β-estradiol libre añadiendo a los pocillos 100 μl de suspensión de DCC al 0,4 % enfriada con hielo. A continuación, las placas deben colocarse en hielo durante 10 minutos y la mezcla de reacción y la suspensión de DCC se deben filtrar mediante transferencia a un filtro de placas de microvaloración para retirar el DCC. A continuación, deben añadirse 100 μl del filtrado al líquido de centelleo en frascos LSC para determinar el número de desintegraciones por minuto (dpm) por frasco mediante recuento de centelleo líquido.
21. Como alternativa, si no se dispone de filtro de microplacas, puede conseguirse la eliminación del DCC mediante centrifugación. A continuación, se deben tomar 50 μl del sobrenadante que contiene el [³H]17β-estradiol unido al hrERα con muchísimo cuidado para evitar cualquier contaminación de los pocillos por contacto con la suspensión de DCC, y deben utilizarse para el recuento de centelleo.
22. El ligando marcado solo se utiliza para determinar las desintegraciones por minuto (dpm) del [³H]17β-estradiol añadido a los pocillos de ensayo. La radiactividad debe cuantificarse justo después de la preparación. Estos pocillos no deben incubarse y no deben tratarse con suspensión de DCC, sino que su contenido debe añadirse directamente al líquido de centelleo. Estas medidas muestran cuánto [³H]17β-estradiol medido en dpm se había añadido a cada conjunto de pocillos en relación con la unión total y con la unión inespecífica.

Ensayo de unión de competencia

23. El ensayo de unión de competencia mide la unión de una única concentración de [³H]17β-estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Deben utilizarse en paralelo tres réplicas de cada concentración en cada tanda. Además, deben realizarse tres tandas no simultáneas con cada producto problema. El ensayo debe configurarse en una o más placas de microvaloración con 96 pocillos.

Testigos

24. Al realizar el ensayo, deben incluirse en cada experimento testigos y disolventes en paralelo (es decir, estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: i) una concentración elevada (desplazamiento máximo, es decir, aproximadamente el desplazamiento completo del ligando radiomarcado) y una media (aproximadamente la CI₅₀) tanto de E2 como del ligando débil, por triplicado; 2) el

testigo de disolvente y la unión inespecífica, cada uno por triplicado. En el protocolo del CERI se describen con detalle los procedimientos para la preparación de la solución amortiguadora y de las soluciones de [^3H]17 β -estradiol, de hrER α y de producto problema (2).

Control del disolvente:

25. El control del disolvente indica que este no interactúa con el sistema de ensayo y que también mide la unión total (TB). El DMSO es el disolvente preferido. Si la concentración más alta del producto problema no es soluble en DMSO, también se podrá utilizar etanol. La concentración de DMSO en los pocillos finales del ensayo debe ser del 2,05 % y podría aumentarse hasta el 2,5 % en caso de falta de solubilidad del producto problema. No deben utilizarse concentraciones de DMSO por encima del 2,5 % debido a la interferencia de las concentraciones más elevadas de disolvente con el ensayo. En el caso de productos problema que no sean solubles en DMSO pero que sí sean solubles en etanol, podrá utilizarse sin interferencias en el ensayo un máximo de etanol del 2 %.

Testigo de la solución amortiguadora:

26. El testigo de la solución amortiguadora (*buffer control*, BC) no debe contener ni disolvente ni producto problema, pero sí todos los demás componentes del ensayo. Los resultados del testigo de la solución amortiguadora se comparan con el testigo de disolvente para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo.

Ligando fuerte (estrógeno de referencia)

27. El 17 β -estradiol (n.º CAS 50-28-2) es el ligando endógeno y se une con gran afinidad al ER, subtipo alfa. Debe prepararse una curva patrón con 17 β -estradiol no marcado para cada uno de los ensayos de unión de competencia al hrER α , para permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo dentro del mismo laboratorio. Deben prepararse ocho soluciones de 17 β -estradiol no marcado en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo que se vayan a utilizar para la curva patrón deben espaciarse como se indica a continuación: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. La concentración más elevada de 17 β -estradiol no marcado (1 μM) debe servir de indicador de unión inespecífica (*non-specific binding*, NSB). Esta concentración se distingue con el rótulo "NSB" en el cuadro 4, aunque también forma parte de la curva patrón.

Ligando débil

28. Debe incluirse un ligando débil [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) o, como alternativa, noretindrona (n.º CAS 68-22-4)] para demostrar la sensibilidad de cada experimento y permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo. Deben prepararse ocho soluciones de ligando débil en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo deben espaciarse como se indica a continuación: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} y 10^{-9} M.

No ligando

29. Debe utilizarse como testigo negativo (no ligando) el octiltriethoxisilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1). Aporta la garantía de que el ensayo, tal como se realiza, detecta los productos problema que no se unen al hrER α . Deben prepararse ocho soluciones de no ligando en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo deben espaciarse como se indica a continuación: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Puede utilizarse como no ligando alternativo el ftalato de di-n-butilo (DBP, n.º CAS 84-72-2), pero solo hasta la concentración de 10^{-4} M. Se ha demostrado que la solubilidad máxima del DBP en el ensayo es de 10^{-4} M.

Concentración del hrER α

30. Debe utilizarse la cantidad del receptor que da una unión específica del 40 ± 10 % (véanse los puntos 12-13 del apéndice 3). La solución de hrER α debe prepararse mediante dilución de hrER α funcional en solución amortiguadora enfriada con hielo, justo antes de su utilización.

[^{3} H]17 β -estradiol

31. La concentración final de [^{3} H]17 β -estradiol en los pocillos de ensayo debe ser de 0,5 nM.

Productos problema

32. En primer lugar, es necesario realizar un ensayo de solubilidad para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al aplicar el protocolo del ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y después se confirma en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no debe ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un control del disolvente, junto con un mínimo de ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, según el límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado (véase también el punto 35 del apéndice 3). Una vez determinado el intervalo de concentraciones para los ensayos, debe someterse a ensayo el producto problema con 8 concentraciones logarítmicas espaciadas de forma adecuada, según los resultados de la determinación del intervalo de concentraciones. Las concentraciones sometidas a ensayo en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse más según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta, en caso necesario.
33. Las diluciones del producto problema deben prepararse en el disolvente adecuado (véase el punto 25 del apéndice 3). Si la concentración más elevada del producto problema no fuera soluble en DMSO o en etanol, y la adición de más disolvente hiciera que la concentración de disolvente en el tubo final fuera mayor que el límite aceptable, la concentración más elevada podría reducirse a la concentración inmediatamente inferior. En este caso, puede añadirse una concentración adicional en el extremo inferior de la serie de concentraciones. Las demás concentraciones de la serie deben permanecer inalteradas.

34. Las soluciones del producto problema deben ser objeto de un estrecho seguimiento cuando se añaden al pocillo del ensayo, ya que el producto problema puede provocar una precipitación cuando se añade al pocillo del ensayo. Los datos de todos los pocillos que contengan precipitado deben quedar excluidos del ajuste de la curva, y debe anotarse el motivo de la exclusión de los datos.
35. Si hay información previa de otras fuentes que proporcionen el log CI₅₀ de un producto problema, puede ser adecuado espaciar geométricamente las diluciones más cerca alrededor del log CI₅₀ previsto (es decir, 0,5 unidades logarítmicas). Los resultados finales deben reflejar la suficiente amplitud de las concentraciones a ambos lados del log CI₅₀, incluidos la “parte superior” y la “parte inferior”, de manera que la curva de unión pueda caracterizarse adecuadamente.

Organización de las placas del ensayo

36. Deben prepararse placas de microvaloración etiquetadas utilizando incubaciones séxtuples del control del disolvente, la concentración más elevada del estrógeno de referencia (E2), que también sirve de indicador de la unión inespecífica (NSB), el testigo de la solución amortiguadora, las ocho concentraciones del testigo no ligando (octiltrietoxisilano), las siete concentraciones inferiores del estrógeno de referencia (E2), las ocho concentraciones del ligando débil (noretinodrel o noretindrona) y las ocho concentraciones de cada producto problema (TC). En el cuadro 4 a continuación figura un ejemplo de diagrama de la disposición de la placa para las curvas de concentración completas correspondientes al estrógeno de referencia y al testigo. Se utilizan placas de microvaloración adicionales para el producto problema y deben incluir testigos de las placas, es decir, 1) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y media (aproximadamente la CI₅₀) tanto del E2 como de un ligando débil, por triplicado; 2) el testigo de disolvente (como unión total) y un ligando inespecífico, cada uno por sextuplicado (cuadro 5). En el apéndice 3.3 se presenta un ejemplo de una hoja de cálculo de la configuración de la placa de microvaloración para el ensayo de competencia con tres productos problema desconocidos. Las concentraciones indicadas en la hoja de cálculo, así como en los cuadros 4 y 5, se refieren a las concentraciones finales utilizadas en cada pocillo de ensayo. La concentración máxima de E2 debe ser 1×10^{-7} M y la del ligando débil debe ser la concentración más elevada utilizada para este en la placa 1. La concentración CI₅₀ debe ser determinada por el laboratorio a partir de su base de datos de testigos históricos. Se espera que este valor sea similar al observado en los estudios de validación (véase el cuadro 1).

Cuadro 4: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia^{1,2}, curvas completas de concentración del estrógeno de referencia y de los testigos (placa 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testigo de la solución amortiguadora y testigo positivo (E2)			Positivo débil (noretinodrel)			Testigo negativo (OTES)			TB y NSB		

A	Blanco*	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M	TB (control del disolvente) (DMSO al 2,05 %)
B	E2 (1×10^{-11} M)	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	
C	E2 (1×10^{-10} M)	$1 \times 10^{-7,5}$ M	1×10^{-8} M	NSB (E2 10^{-6} M)
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)	1×10^{-7} M	1×10^{-7} M	
E	E2 (1×10^{-9} M)	$1 \times 10^{-6,5}$ M	1×10^{-6} M	Testigo de la solución amortiguadora
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	
G	E2 (1×10^{-8} M)	$1 \times 10^{-5,5}$ M	1×10^{-4} M	Blanco (de marcado)**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

¹ Muestra elaborada para la placa de microvaloración de los patrones que ha de someterse a ensayo con cada experimento.

² Obsérvese que esta placa de microvaloración se forma con las diluciones hechas en la placa de dilución descrita para los patrones en las secciones anteriores.

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

* Blanco real, pocillo no utilizado.

** Blanco, no utilizado durante la incubación, pero sí utilizado para confirmar la radiactividad total añadida.

Cuadro 5: Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, placas adicionales para los productos problema (TC) y los testigos de las placas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Producto problema-1 (TC-1)			Producto problema-2 (TC-2)			Producto problema-3 (TC-3)			Testigos		
<i>A</i>	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
<i>B</i>	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (CI ₅₀)		
<i>C</i>	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)		
<i>D</i>	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (CI ₅₀)		
<i>E</i>	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (E2 10^{-6} M)		
<i>F</i>	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
<i>G</i>	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (control del disolvente)		
<i>H</i>	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

Terminación del ensayo de unión de competencia

37. Salvo en los pocillos destinados a la unión total y los blancos (de marcado), como se indica en el cuadro 6, se deben colocar en cada pocillo 50 µl de la solución amortiguadora de ensayo, y se deben mezclar con 10 µl de control del disolvente, estrógeno de referencia

(E2), ligando débil, no ligando y productos problema, o, según corresponda, con 10 µl de una solución 5 nM de [³H]17β-estradiol. A continuación, se deben añadir a cada placa 30 µl de solución de receptor enfriada con hielo y se mezcla suavemente. La solución de hrERα debe ser el último reactivo que se añada. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a temperatura ambiente (22 ° a 28 °C) durante 2 horas.

Cuadro 6: Volumen de los componentes del ensayo para las placas de un ensayo de unión de competencia, placas de microvaloración.

<i>Etapas de preparación según los números de las columnas</i>		Excepto los pocillos TB	Pocillos TB	Blanco (de marcado)
Volumen de los componentes de los pocillos de reacción indicados arriba y orden de adición	Solución amortiguadora del ensayo a temperatura ambiente	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 no marcado, ligando débil, no ligando, disolvente y productos problema*	10 µl	-	-
	[³ H]17β-estradiol para obtener una concentración final de 0,5 nM (es decir, 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentración de hrERα según se haya determinado (véanse los puntos 12-13)	30 µl	30 µl	-
Volumen total en cada pocillo del ensayo		100 µl	100 µl	100 µl

* Adecuadamente preparados para obtener la concentración final dentro del intervalo aceptable de concentraciones del disolvente.

38. A continuación debe llevarse a cabo la cuantificación del [³H]17β-estradiol unido al hrERα, tras la separación del [³H]17β-estradiol unido al hrERα respecto al [³H]17β-estradiol libre mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de suspensión de DCC enfriada con hielo, como se describe en los puntos 21 a 23 del apéndice 3 en relación con el ensayo de unión de saturación.
39. Los pocillos G10-12 y H10-12 [identificados como blanco (de marcado) en el cuadro 4] presentan las dpm del estradiol marcado con [³H] en 10 µl. La alícuota de 10 µl debe añadirse directamente al líquido de centelleo.

Criterios de aceptabilidad

Ensayo de unión de saturación

40. La curva de la unión específica debe alcanzar una meseta a medida que se utilizan concentraciones crecientes de [³H]17β-estradiol, lo que indica la saturación del hrERα con el ligando.
41. La unión específica a la concentración de 0,5 nM de [³H]17β-estradiol debe situarse en el intervalo aceptable del 30 % - 50 % de la radiactividad total medida media que se ha añadido en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa

significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas y repetirse el ensayo de saturación.

42. Los datos deben corresponder a una gráfica lineal de Scatchard.

43. La unión inespecífica no debe ser excesiva. El valor de la unión inespecífica debe ser típicamente $< 35 \%$ de la unión total. Sin embargo, la proporción puede superar ocasionalmente este límite cuando se miden valores muy bajos de dpm con la concentración más baja de 17β -estradiol radiomarcado.

Ensayo de unión de competencia

44. El aumento de las concentraciones de 17β -estradiol no marcado debe desplazar el $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol del receptor de manera coherente con una unión de competencia a un solo punto.

45. El valor de CI_{50} para el estrógeno de referencia (es decir, el 17β -estradiol) debe ser aproximadamente igual a la concentración molar del $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol más la K_d determinada a partir del ensayo de unión de saturación.

46. La unión específica total debe estar sistemáticamente dentro del intervalo aceptable del $40 \pm 10 \%$ cuando la concentración media medida de la radiactividad total añadida a cada pocillo es de 0,5 nM en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas.

47. El disolvente no debe alterar la sensibilidad ni la reproducibilidad del ensayo. Los resultados del control del disolvente (pocillos TB) se comparan con el testigo de la solución amortiguadora para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo. Los resultados del testigo de la TB y de la solución amortiguadora deben ser comparables si el disolvente no produce ningún efecto sobre el ensayo.

48. El no ligando no debe desplazar más del 25 % del $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol del hrER α cuando se somete a ensayo hasta la concentración de 10^{-3} M (OTES) o 10^{-4} M (DBP).

49. Se han establecido criterios de comportamiento para el estrógeno de referencia y dos ligandos débiles (por ejemplo, noretinodrel, noretindrona) utilizando los datos del estudio de validación del ensayo del CERI de unión al hrER (anexo N de la referencia 2). Se aportan los intervalos de confianza del 95 % para la media (n) $\pm$ DT de todas las tandas de los testigos en cuatro laboratorios participantes en el estudio de validación. Se calcularon los intervalos de confianza del 95 % para los parámetros de ajuste de las curvas (es decir, parte superior, parte inferior, pendiente de Hill y $\log \text{CI}_{50}$) en relación con el estrógeno de referencia y los ligandos débiles, y para el $\log_{10}$ RBA de los ligandos débiles en relación con el estrógeno de referencia. En el cuadro 1 se ofrecen los intervalos previstos para los parámetros de ajuste de la curva que pueden utilizarse como criterios de comportamiento.

En la práctica, el intervalo de la CI_{50} puede variar ligeramente según la K_d obtenida experimentalmente del preparado del receptor y la concentración del ligando.

50. No se han establecido criterios de comportamiento sobre los parámetros de ajuste de la curva en relación con los productos problema debido a la amplia gama de productos problema que puede haber y a la variación de las posibles afinidades y resultados (por ejemplo, ajuste de la curva completa o de la curva parcial, o sin ajuste alguno). Sin embargo, a la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional. Debe utilizarse un intervalo suficiente de concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior (p. ej., 90 - 100 % de unión) de la curva de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas en momentos diferentes, debe ser razonable y científicamente justificable. Los testigos de cada tanda de un producto problema deben aproximarse a las medidas de comportamiento notificadas para este ensayo del CERI y deben ser coherentes con los datos históricos de los testigos de cada laboratorio respectivo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Ensayo de unión de saturación

51. Se mide tanto la unión total como la inespecífica. A partir de estos valores, se calcula la unión específica con concentraciones en aumento de $[^3H]17\beta$ -estradiol en condiciones de equilibrio, restando la inespecífica de la total. La gráfica de la unión específica frente a la concentración de $[^3H]17\beta$ -estradiol debe alcanzar una meseta para la unión específica máxima, lo cual indica la saturación del $hrER\alpha$ con el $[^3H]17\beta$ -estradiol. Por otra parte, el análisis de los datos debe documentar la unión del $[^3H]17\beta$ -estradiol a un solo punto de unión de elevada afinidad. En la curva de unión de saturación deben ponerse de manifiesto la unión inespecífica, la total y la específica. El posterior análisis de estos datos debe utilizar una regresión no lineal (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) con una representación final de los datos como gráfica de Scatchard.
52. El análisis de los datos debe determinar los parámetros B_{max} y K_d a partir solo de los datos de unión total, aceptando que la unión inespecífica es lineal, salvo que se justifique utilizar otro método. Además, a la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. Al determinar los parámetros B_{max} y K_d a partir de los datos de la unión de saturación, siempre debe aplicarse una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos (p. ej., utilizando el método de Swillens, 1995).

Ensayo de unión de competencia

53. La curva de unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del $[^3H]17\beta$ -estradiol frente a la concentración (unidades $\log_{10}$) del competidor. La

concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del [^3H]17 β -estradiol es el valor de la CI_{50} .

54. Deben estimarse los valores de $\log \text{CI}_{50}$ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y $\log \text{CI}_{50}$ deben dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. No debe utilizarse ninguna corrección por el agotamiento de los ligandos. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil debe calcularse como porcentaje del $\log \text{CI}_{50}$ del ligando débil respecto al $\log \text{CI}_{50}$ del 17 β -estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando las medidas del comportamiento del ensayo de los puntos 44 - 49 del presente apéndice 3.
55. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de unión de competencia se clasifica correctamente. Se recomienda que cada tanda con el producto problema se someta inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles (véase el punto 54 del presente apéndice 3). Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de la curva, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de [^3H]17 β -estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto problema, y la de la coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente.

Interpretación de los datos

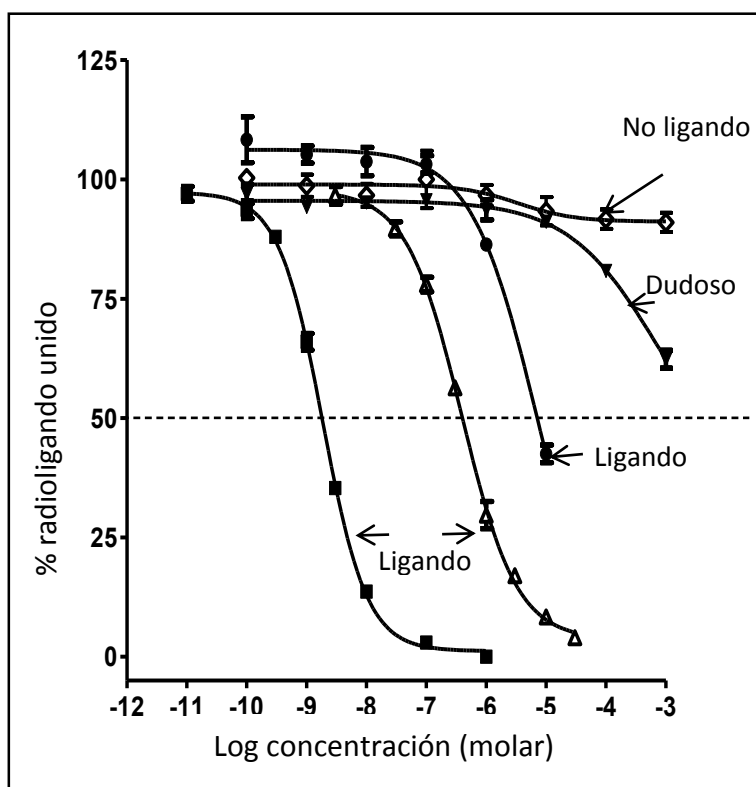
56. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es un ligando del hrER α si puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de los datos es inferior al 50 % (figura 1).
57. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es no ligando del hrER α si:
- puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %, o
 - no puede ajustarse una curva de unión y la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %.

58. Los productos problema se consideran dudosos si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores (por ejemplo, el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

Cuadro 7: Criterios de asignación de la clasificación a un producto problema sobre la base de una curva de unión de competencia.

Clasificación	Criterios
Ligando ^a	Puede ajustarse una curva de unión. El punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de datos es inferior al 50 %.
No ligando ^b	Si puede ajustarse una curva de unión, - el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %. Si no puede ajustarse una curva de unión, - la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %.
Dudoso ^c	Cualquier producto sometido al ensayo que no sea ni ligando ni no ligando (p. ej., el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

Figura 1: Ejemplos de clasificación de productos problema utilizando una curva de unión de competencia.



59. Se combinan las diversas tandas realizadas con un producto problema dentro de un laboratorio, asignando un valor numérico a cada tanda y promediando entre ellas, como se muestra en el cuadro 8. Los resultados de las tandas combinadas dentro de cada laboratorio se comparan con la clasificación prevista de cada producto problema.

Cuadro 8: Método de clasificación del producto problema mediante varias tandas dentro de un laboratorio

Asignar valor a cada tanda:	
Clasificación	Valor numérico
Ligando	2
Dudoso	1
No ligando	0
Clasificar según la media de los valores numéricos de las tandas:	
Clasificación	Valor numérico
Ligando	$\text{Media} \geq 1,5$
Dudoso	$0,5 \leq \text{Media} < 1,5$
No ligando	$\text{Media} < 0,5$

INFORME DEL ENSAYO

60. Véase el punto 24 de la sección “COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER” de este método de ensayo.

Apéndice 3.1

RELACIÓN DE TÉRMINOS

[³H]E2: 17 β -estradiol radiomarcado con tritio.

DCC: Carbón recubierto de dextrano.

E2: 17 β -Estradiol no marcado (inerte).

Solución amortiguadora del ensayo: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, con EDTA 1 mM, EGTA 1mM, NaVO₃ 1 mM, 10 % de glicerol, leupeptina 0,2 mM, ditiotretitol 1 mM y 10 mg/ml de seroalbúmina bovina.

hrER α : Receptor estrogénico recombinante humano alfa (dominio de unión al ligando).

Réplica: Cada uno de los diversos pocillos que tienen el mismo contenido a la misma concentración y se someten a ensayo simultáneamente dentro de una misma tanda. En este protocolo, cada concentración del producto problema se somete al ensayo por triplicado; es decir, hay tres réplicas que se someten simultáneamente al ensayo con cada concentración del producto problema.

Tanda: Conjunto completo de pocillos de ensayo en placas de microvaloración sometidos a ensayo a la vez, que aporta toda la información necesaria para caracterizar la unión de un producto problema al hrER α (a saber, [³H]17 β -estradiol total añadido al pocillo de ensayo, unión máxima del [³H]17 β -estradiol al hrER α , unión inespecífica, y unión total a diversas concentraciones del producto problema). Una tanda podría consistir simplemente en un solo pocillo (es decir, una réplica) por concentración, pero, puesto que este protocolo requiere que los ensayos se realicen por triplicado, una tanda estará compuesta por tres pocillos de ensayo por cada concentración. Además, este protocolo exige la realización de tres tandas independientes (es decir, no simultáneas) por producto.

Apéndice 3.2

DISTRIBUCIÓN DE LOS POCILLOS PARA EL ENSAYO DE UNIÓN DE COMPETENCIA

Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (μl)	Volumen de solución amortiguadora (μl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (μl)	Volumen tomado de la placa de dilución (μL)	Volumen final (μl)	Concentración final del competidor (M)
S	A1	1	Blanco	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanco	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanco	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 no marcado	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	E2 no marcado	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	E2 no marcado	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	E2 no marcado	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	E2 no marcado	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	E2 no marcado	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	E2 no marcado	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	E2 no marcado	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	E2 no marcado	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	E2 no marcado	S	S4	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	E2 no marcado	S	S4	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	E2 no marcado	S	S4	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	E2 no marcado	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	E2 no marcado	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	E2 no marcado	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	E2 no marcado	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	E2 no marcado	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	E2 no marcado	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	E2 no marcado	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	E2 no marcado	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	E2 no marcado	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hrER (µl)	Volumen de solución amortiguadora (µl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (µl)	Volumen tomado de la placa de dilución (µL)	Volumen final (µl)	Concentración final del competidor (M)
S	H4	1	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	Unión total	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	Unión total	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	Unión total	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	Unión total	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	Unión total	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	Unión total	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	E2 no marcado (elevada)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	E2 no marcado (elevada)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	E2 no marcado (elevada)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	E2 no marcado (elevada)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	E2 no marcado (elevada)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	E2 no marcado (elevada)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Testigo de la solución amortiguadora	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Blanco (de marcado)	Marcado	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Blanco (de marcado)	Marcado	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blanco (de marcado)	Marcado	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blanco (de marcado)	Marcado	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blanco (de marcado)	Marcado	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blanco (de marcado)	Marcado	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Obsérvese que los pocillos “marcados” están vacíos durante la incubación. Los 10 µl se añaden solo para el recuento de centelleo.

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hr-ER (µl)	Volumen de solución amortiguadora (µl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (µl)	Volumen tomado de la placa de dilución (µL)	Volumen final (µl)	Concentración final del competidor (M)
P1	A1	1	Desconocido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Desconocido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Desconocido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Desconocido 1	U1	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Desconocido 1	U1	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Desconocido 1	U1	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Desconocido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Desconocido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Desconocido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Desconocido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Desconocido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Desconocido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Desconocido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Desconocido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Desconocido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Desconocido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Desconocido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Desconocido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Desconocido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Desconocido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Desconocido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Desconocido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Desconocido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	Desconocido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Desconocido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Desconocido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Desconocido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Desconocido 2	U2	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Desconocido 2	U2	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Desconocido 2	U2	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Desconocido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Desconocido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Desconocido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Desconocido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Desconocido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Desconocido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Desconocido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Desconocido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Desconocido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Desconocido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Desconocido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Desconocido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Desconocido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Desconocido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Desconocido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Desconocido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Desconocido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Desconocido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia												
Placa	Posición	Réplica	Tipo de pocillo	Código del pocillo	Código de la concentración	Concentración inicial del competidor (M)	Solución madre de hr-ER (µl)	Volumen de solución amortiguadora (µl)	Volumen del marcador (E2 marcado) (µl)	Volumen tomado de la placa de dilución (µL)	Volumen final (µl)	Concentración final del competidor (M)
P1	A7	1	Desconocido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Desconocido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Desconocido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Desconocido 3	U3	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Desconocido 3	U3	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Desconocido 3	U3	2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Desconocido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Desconocido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Desconocido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Desconocido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Desconocido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Desconocido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Desconocido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Desconocido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Desconocido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Desconocido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Desconocido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Desconocido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Desconocido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Desconocido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Desconocido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Desconocido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Desconocido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Desconocido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Testigo E2 (máx)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Testigo E2 (máx)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Testigo E2 (máx)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Testigo E2 (CI ₅₀)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Testigo E2 (CI ₅₀)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Testigo E2 (CI ₅₀)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Testigo NE (máx)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Testigo NE (máx)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Testigo NE (máx)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Testigo NE (CI ₅₀)	S	NE CI ₅₀ 1	NE CI ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NE CI ₅₀
P1	D11	2	Testigo NE (CI ₅₀)	S	NE CI ₅₀ 2	NE CI ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NE CI ₅₀
P1	D12	3	Testigo NE (CI ₅₀)	S	NE CI ₅₀ 3	NE CI ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NE CI ₅₀
P1	E10	1	E2 no marcado (elevada)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 no marcado (elevada)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 no marcado (elevada)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 no marcado (elevada)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 no marcado (elevada)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 no marcado (elevada)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	Unión total	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	Unión total	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	Unión total	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	Unión total	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	Unión total	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	Unión total	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

Apéndice 4

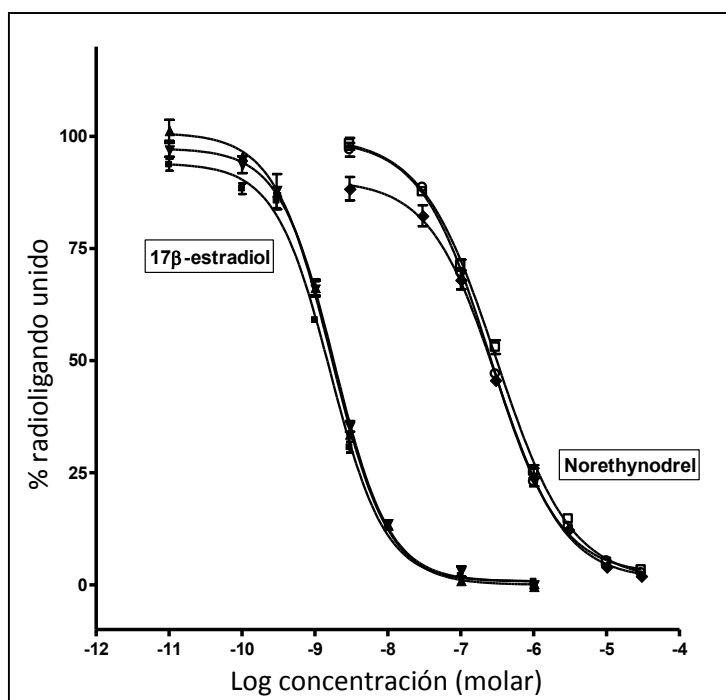
CONSIDERACIONES PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS PROCEDENTES DEL ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE COMPETENCIA AL HRER

1. El ensayo de unión de competencia al hrER α mide la unión de una única concentración de [³H]17 β -estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. La curva de la unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del [³H]17 β -estradiol frente a la concentración (unidades log₁₀) del competidor. La concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del [3H]17 β -estradiol es la CI₅₀.

Análisis de datos para el estrógeno de referencia y el ligando débil (1)

2. Los datos de las tandas de testigos se transforman (es decir, el porcentaje de la unión específica del [³H]17 β -estradiol y la concentración logarítmica del producto testigo) para su posterior análisis. Deben estimarse los valores de log CI₅₀ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; GraphPad Prism) (2). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y log CI₅₀ pueden dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. No fue necesario utilizar ninguna corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos en los ensayos FW o CERI, pero puede considerarse en caso necesario. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil puede calcularse como porcentaje del log CI₅₀ del ligando débil respecto al log CI₅₀ del 17 β -estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando medidas de comportamiento del ensayo y criterios de aceptabilidad, tal como se describe en el presente método de ensayo (punto 20), en el apéndice 2 (ensayo de FW, antes citado, puntos 41 a 51) y en el apéndice 3 (ensayo del CERI, puntos 41 a 51). En la figura 1 se muestran ejemplos de tres tandas para el estrógeno de referencia y el ligando débil.

Figura 1. Ejemplos de curvas de la unión de competencia para el estrógeno de referencia y para el ligando débil testigo.

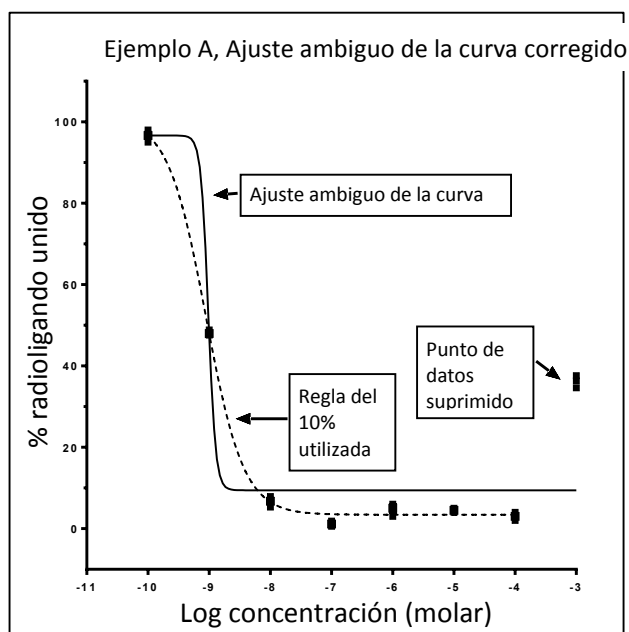


Análisis de datos de los productos problema

3. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de la unión de competencia se clasifica correctamente. Cada tanda con el producto problema debe someterse inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles. Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de la curva, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de [^3H]17 β -estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto, y la de la coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente. A la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional, y los datos utilizados para clasificar cada producto problema como ligando o no ligando deben ser científicamente justificables.
4. En ocasiones puede haber ejemplos de datos que requieran una atención adicional para analizar e interpretar adecuadamente los datos de unión al hrER. Los estudios anteriores habían mostrado casos en los que el análisis y la interpretación de los datos sobre la unión a receptores de competencia pueden complicarse debido a un aumento del porcentaje de la

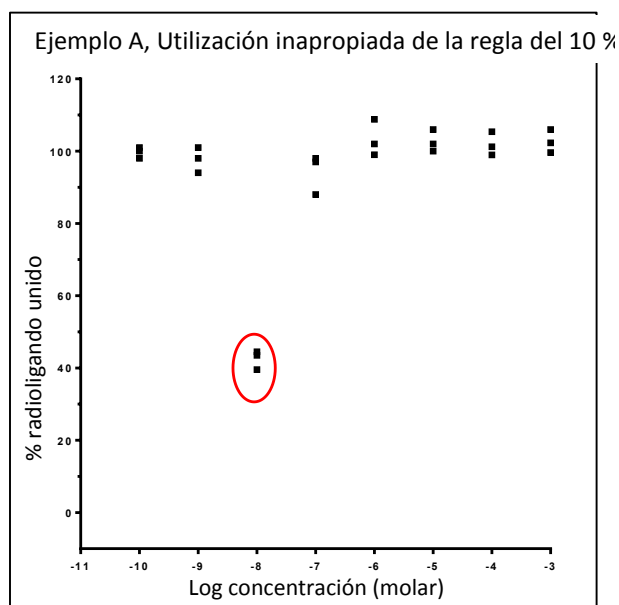
unión específica cuando se someten a ensayo productos a las concentraciones más altas (figura 2). Se trata de una cuestión muy conocida que se ha presentado al utilizar protocolos para una serie de ensayos de unión a receptores de competencia (3). En estos casos, se observa una respuesta dependiente de la concentración a concentraciones más bajas pero, al aproximarse la concentración del producto problema al límite de solubilidad, el desplazamiento del [^3H]17 β -estradiol deja de disminuir. En estos casos, los datos de las concentraciones más elevadas indican que se ha alcanzado el límite biológico del ensayo. Por ejemplo, este fenómeno se asocia muchas veces a la insolubilidad y la precipitación del producto a altas concentraciones, o también puede ser un reflejo de la superación de la capacidad que tiene el carbón recubierto de dextrano para atrapar el ligando radiomarcado libre durante el procedimiento de separación a las concentraciones más elevadas del producto. El incluir estos puntos de datos cuando se ajustan los datos de la unión de competencia a una curva sigmoidea puede dar lugar a veces a una clasificación errónea del potencial de unión al ER de un producto problema (figura 2). Para evitarlo, el protocolo de los ensayos de unión al hrER de FW y del CERI incluye una opción para excluir de los análisis los puntos de datos en los que la media de las réplicas del porcentaje de unión específica del [^3H]17 β -estradiol supera al menos en el 10 % a la media observada a una concentración inferior (esto es lo que suele denominarse la regla del 10 %). Esta regla solo puede utilizarse una vez con una curva determinada y deben seguir quedando datos correspondientes a un mínimo de seis concentraciones, de forma que la curva pueda clasificarse correctamente.

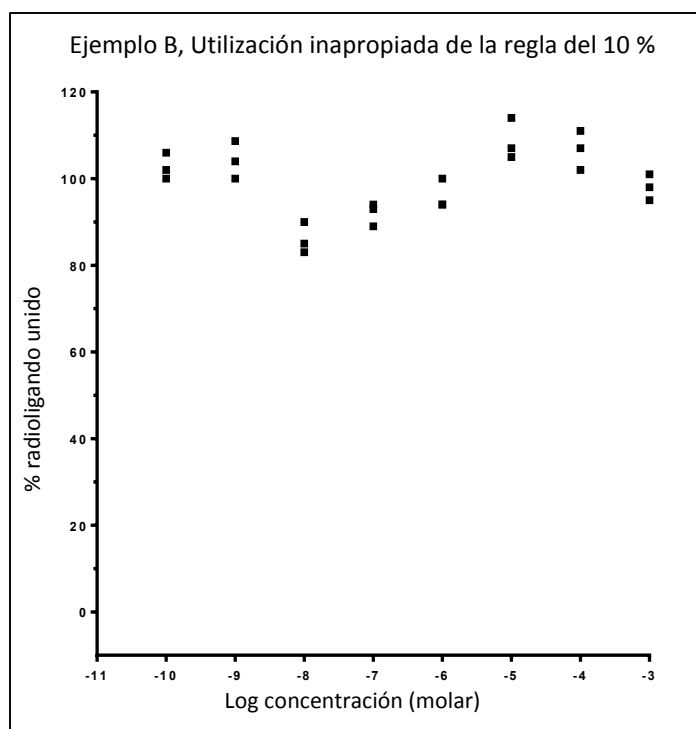
Figura 2. Ejemplos de curvas de unión de competencia con y sin aplicación de la regla del 10 %.



5. El uso adecuado de la regla del 10 % para corregir estas curvas debe considerarse cuidadosamente y reservarse para aquellos casos en los que haya una clara indicación de unión al hrER. Durante la realización de experimentos para el estudio de validación del ensayo de unión al hrER de FW, se observó que la regla del 10 % tenía a veces una consecuencia imprevista y no deseada. Los productos que no interactuaban con el receptor (es decir, los no ligandos verdaderos) a menudo presentaban una variabilidad alrededor del 100 % de unión del radioligando la cual era superior al 10 % en toda la gama de concentraciones ensayadas. Si resultaba que el valor más bajo se encontraba a una concentración baja, los datos de todas las concentraciones superiores podrían eliminarse del análisis utilizando la regla del 10 %, aunque tales concentraciones podrían ser útiles para establecer que el producto es un ligando. El gráfico 3 muestra ejemplos en los que el uso de la regla del 10 % no es adecuado.

Figura 3. Ejemplos de datos de unión de competencia en los que la utilización de la regla del 10 % no es adecuada.





Bibliografía

- (1) OCDE (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.