



Consejo de la
Unión Europea

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

6800/19
ADD 2

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

Asunto: Anexo al 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 al D060575/02.

Adj.: Anexo al D060575/02

B.71. ESTUDIOS DE SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO* RELATIVOS AL FENÓMENO CLAVE DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RUTA DE RESULTADOS ADVERSOS (AOP) DE LA SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA

INTRODUCCIÓN GENERAL

Método de ensayo basado en el fenómeno clave de la activación de las células dendríticas

1. Un sensibilizante cutáneo es una sustancia que induce una respuesta alérgica por contacto con la piel, tal como se define en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas) (1) y en el Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea¹. Existe un acuerdo general sobre los principales fenómenos biológicos subyacentes a la sensibilización cutánea. El conocimiento actual de los mecanismos químicos y biológicos asociados a la sensibilización cutánea se ha resumido como una ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) en el marco del programa AOP de la OCDE (2), empezando por el fenómeno iniciador molecular y pasando por fenómenos intermedios hasta llegar al efecto adverso, a saber, la dermatitis alérgica de contacto. En este caso, el fenómeno iniciador molecular (es decir, el primer fenómeno clave) es la unión covalente de sustancias electrofílicas a los centros nucleofílicos de las proteínas de la piel. El segundo fenómeno clave en esta AOP tiene lugar en los queratinocitos e incluye respuestas inflamatorias, así como cambios en la expresión génica relacionada con rutas específicas de comunicación celular, tales como las rutas dependientes del elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (ARE, *antioxidant/electrophile response element*). El tercer fenómeno clave es la activación de las células dendríticas (DC, *dendritic cells*), normalmente evaluada por la expresión de marcadores específicos de superficie celular, quimiocinas y citocinas. El cuarto fenómeno clave es la activación y proliferación de las células T, que se evalúa indirectamente en el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA, *Local Lymph Node Assay*) de muridos (3).

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).

2. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 442E de la OCDE (2017). Describe los ensayos *in vitro* que abordan los mecanismos descritos en el fenómeno clave de la activación de las células dendríticas en la AOP de la sensibilización cutánea (2). El método de ensayo comprende los ensayos que deben utilizarse para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP.

Los ensayos descritos en el presente método de ensayo son los siguientes:

- Ensayo de activación de la línea celular humana (h-CLAT),
 - Ensayo de activación de la línea celular U937 (U-SENSTM),
 - Ensayo del gen marcador de la interleucina-8 (ensayo IL-8 Luc).
3. Los ensayos incluidos en el presente método de ensayo y las TG de la OCDE correspondientes pueden diferir en relación con el procedimiento utilizado para generar los datos y los resultados medidos, pero pueden utilizarse de forma indiscriminada para satisfacer los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos relativos al fenómeno clave de la activación de las células dendríticas en la AOP de la sensibilización cutánea, beneficiándose al mismo tiempo de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en el método de ensayo basado en el fenómeno clave

4. Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización cutánea se hacía con animales de laboratorio. Los métodos clásicos con cobayas, como el ensayo de maximización con cobayas (GMPT, *Guinea Pig Maximisation Test*) de Magnusson y Kligman y el ensayo de Buehler (método de ensayo B.6) (4), estudian tanto la fase de inducción como la de desencadenamiento de la sensibilización cutánea. Los ensayos con múridos, el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA, *Local Lymph Node Assay*) (método de ensayo B.42) (3) y sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA (método de ensayo B.50) (5) y el LLNA: BrdU-ELISA (método de ensayo B.51) (6), evalúan toda la respuesta de inducción exclusivamente, y también han conseguido su reconocimiento, ya que presentan una ventaja en relación con los ensayos con cobayas en términos de bienestar animal, junto con una medición objetiva de la fase de inducción de la sensibilización cutánea.
5. Recientemente se han adoptado para contribuir a la evaluación del potencial de peligro de sensibilización cutánea de los productos varios métodos de ensayo *in chemico* e *in vitro* de base farmacodinámica relativos al primer fenómeno clave (método de ensayo B.59; Ensayo directo de reactividad peptídica) (7) y el segundo fenómeno clave (método de ensayo B.60; Método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2) (8) de la AOP de la sensibilización cutánea.

6. Los ensayos descritos en el presente método de ensayo cuantifican el cambio en la expresión de los marcadores de superficie celular asociados al proceso de activación de los monocitos y DC tras la exposición a sensibilizantes (por ejemplo, CD54, CD86), o los cambios en la expresión de la IL-8, citocina asociada a la activación de las DC. Se ha comunicado que ciertos sensibilizantes cutáneos inducen la expresión de marcadores de membrana celular como, por ejemplo, CD40, CD54, CD80, CD83 y CD86, además de inducir la producción de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β y la TNF- α , y de varias quimiocinas, como la IL-8 (CXCL8) y la CCL3 (9) (10) (11) (12), asociadas con la activación de las DC (2).
7. Sin embargo, como la activación de las DC representa por sí sola un fenómeno clave de la AOP de la sensibilización cutánea (2) (13), la información generada con los ensayos que miden los marcadores de la activación de las DC solas puede no ser suficiente para concluir sobre la presencia o la ausencia de potencial de sensibilización cutánea de los productos. Por consiguiente, se proponen los datos generados con los ensayos descritos en el presente método de ensayo como ayuda para discriminar entre los sensibilizantes cutáneos (es decir, la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y los no sensibilizantes, cuando se utilicen en los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), junto con otros datos complementarios pertinentes derivados, por ejemplo, de ensayos *in vitro* relativos a otros fenómenos clave de la AOP de la sensibilización cutánea, así como métodos que no sean de ensayo, incluida la extrapolación a partir de análogos químicos (13). Se han publicado ejemplos de la utilización de los datos obtenidos con estos ensayos en enfoques definidos, es decir, enfoques normalizados tanto en relación con el conjunto de fuentes de información utilizadas como en el procedimiento aplicado a los datos para obtener asignaciones (13), y pueden emplearse como elementos útiles en el marco de los IATA.
8. Los ensayos descritos en este método de ensayo no pueden utilizarse solos, ni para clasificar los sensibilizantes cutáneos en las subcategorías 1A y 1B definidas por el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, en el caso de las autoridades que apliquen estas dos subcategorías facultativas, ni para asignar la potencia a efectos de las decisiones de evaluación de la seguridad. Sin embargo, dependiendo del marco normativo, los resultados positivos generados con estos métodos pueden utilizarse por sí solos para clasificar un producto en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

9. En este método de ensayo se utiliza el término “producto problema” para referirse a lo que se somete a ensayo¹, y no está relacionado con la aplicabilidad de los ensayos al estudio de sustancias de un solo componente, sustancias de componentes múltiples y/o mezclas. Actualmente, se dispone de información limitada sobre la aplicabilidad de los ensayos a las sustancias de componentes múltiples / mezclas (14) (15). Sin embargo, los ensayos son técnicamente aplicables a las sustancias de componentes múltiples y 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 qué². Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Por otra parte, al ensayar sustancias de componentes múltiples o mezclas, deben tenerse en cuenta las posibles interferencias de componentes citotóxicos con las respuestas obtenidas.

¹ En junio de 2013, la reunión conjunta de la OCDE acordó que, en la medida de lo posible, en las directrices de ensayo de la OCDE nuevas y actualizadas se debía respetar un uso más coherente del término «producto problema» para describir lo que se somete a ensayo.

² Esta frase se propuso y se aprobó en la reunión del WNT de abril de 2014.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Sexta edición revisada. Nueva York & Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en:
https://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_s.html.
- (2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponible en:
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Capítulo B.42 del presente anexo: Ensayo con ganglios linfáticos locales. Capítulo B.6 del presente anexo: Sensibilización de la piel.
- (4) Capítulo B.50 del presente anexo: Sensibilización cutánea: Ensayo con ganglios linfáticos locales: DA.
- (5) Capítulo B.51 del presente anexo: Sensibilización cutánea: Ensayo con ganglios linfáticos locales: BrdU-ELISA.
- (6) Capítulo B.59 del presente anexo: Sensibilización cutánea *in chemico*: Ensayo directo de reactividad peptídica (DPRA).
- (7) Capítulo B.60 del presente anexo: Sensibilización cutánea *in vitro*: Método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OCDE (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Apéndice 1

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA (H-CLAT)

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. El ensayo h-CLAT cuantifica los cambios en la expresión de los marcadores de superficie celular asociados al proceso de activación de los monocitos y de las células dendríticas (DC) (es decir, CD86 y CD54), en la línea celular de la leucemia monocítica humana (THP-1), tras la exposición a sensibilizantes (1) (2). Los niveles de expresión medidos en los marcadores de superficie celular CD86 y CD54 se utilizan a continuación para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.
2. El ensayo h-CLAT se ha evaluado en un estudio de validación coordinado por el laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (EURL ECVAM), con posterior revisión por pares independientes en el Comité Científico Consultivo del ECVAM (ESAC). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, el EURL ECVAM recomendó que el h-CLAT se utilizara como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado (3). En la bibliografía se recogen ejemplos del uso de datos del h-CLAT en combinación con otra información (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Se ha demostrado que el h-CLAT puede transferirse a laboratorios con experiencia en técnicas de cultivo celular y análisis de citometría de flujo. El nivel de reproducibilidad de las asignaciones que cabe esperar del ensayo es del orden del 80 % dentro de un laboratorio y entre laboratorios (3) (12). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (13) y otros estudios publicados (14) indican en general que, en comparación con los resultados del LLNA, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 85 % (N = 142), con una sensibilidad del 93 % (94/101) y una especificidad del 66 % (27/41) [sobre la base de un nuevo análisis por el EURL ECVAM (12), considerando todos los datos existentes y no teniendo en cuenta los resultados negativos correspondientes a productos con un valor de log Kow superior a 3,5, como se describe en el punto 4]. Es más probable que las asignaciones negativas falsas con el ensayo h-CLAT afecten a los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que a los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada

(es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (4) (13) (15). En conjunto, esta información indica la utilidad del método del h-CLAT para contribuir a la identificación del peligro de sensibilización cutánea. Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el h-CLAT utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el h-CLAT es aplicable a productos problema que abarcan diversos grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (3) (14) (15). El método h-CLAT es aplicable a los productos problema solubles o que forman una dispersión estable (es decir, un coloide o una suspensión en la que el producto problema no sedimenta ni se separa del disolvente o vehículo para formar distintas fases) en un disolvente o vehículo adecuado (véase el punto 14). Los productos problema con un valor de log Kow superior a 3,5 tienden a producir resultados falsos negativos (14). Por tanto, no deben tenerse en cuenta los resultados negativos con productos problema cuyo valor de log Kow es superior a 3,5. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos con productos problema cuyo valor de log Kow es superior a 3,5 podrían seguir utilizándose para justificar la identificación del producto problema como sensibilizante cutáneo. Por otra parte, debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular utilizada (16) y debido a las condiciones experimentales, pueden obtenerse también resultados negativos en el h-CLAT (15) con los pro-haptenos (es decir, sustancias que requieren activación enzimática, por ejemplo mediante enzimas P450) y los pre-haptenos (es decir, productos activados por oxidación), en particular con una baja velocidad de oxidación. Los productos problema fluorescentes pueden evaluarse con el h-CLAT (17); sin embargo, los productos problema muy fluorescentes que emiten a la misma longitud de onda que el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o que el yoduro de propidio (PI), pueden interferir con la detección por citometría de flujo y, por tanto, no pueden evaluarse correctamente utilizando anticuerpos conjugados con el FITC o PI. En tal caso, pueden utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromos u otros marcadores de citotoxicidad, según corresponda, siempre que se demuestre que proporcionan resultados similares a los de los anticuerpos marcados con FITC (véase el punto 24) o PI (véase el punto 18), por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 1.2. A la luz de lo anterior, los resultados negativos deben interpretarse en el contexto de las limitaciones indicadas y junto con otras fuentes de información en el marco de los enfoques IATA. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del

método h-CLAT a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este método con tales categorías específicas.

5. Tal como se ha descrito anteriormente, el método h-CLAT sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. No obstante, puede contribuir también a la evaluación de la potencia sensibilizante (4) (5) (9) cuando se utiliza en enfoques integrados, como los enfoques IATA. Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos con seres humanos, para determinar de qué modo los resultados del h-CLAT pueden informar sobre la evaluación de la potencia.
6. En el apéndice 1.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. El método h-CLAT es un ensayo *in vitro* que cuantifica los cambios de la expresión de los marcadores de superficie celular (es decir, CD86 y CD54) de la línea celular THP-1 de la leucemia monocítica humana, tras una exposición de 24 horas al producto problema. Estas moléculas de superficie son marcadores típicos de la activación de las células THP-1 monocíticas y pueden imitar la activación de las DC, la cual desempeña un papel fundamental en la estimulación de las células T. Los cambios en la expresión de los marcadores de superficie se miden mediante citometría de flujo tras la tinción celular mediante anticuerpos marcados con fluorocromo. También se lleva a cabo simultáneamente una medición de la citotoxicidad con el fin de evaluar si a concentraciones subcitotóxicas se produce un incremento de la expresión de los marcadores de superficie. Se calcula la intensidad de la fluorescencia relativa de los marcadores de superficie en comparación con el control del disolvente o de vehículo y se utiliza en el modelo de asignación (véase el punto 26), a fin de justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

8. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias recomendadas al efecto en el apéndice 1.2. Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 11) y con los testigos positivos y el control del disolvente/vehículo (véanse los puntos 20 a 22), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

PROCEDIMIENTO

9. Este ensayo se basa en el protocolo n.º 158 de servicio de la base de datos de h-CLAT sobre métodos alternativos a la experimentación con animales (DB-ALM) (18) que constituye el protocolo utilizado para el estudio de validación coordinado por el EURL ECVAM. Se recomienda que se siga este protocolo cuando se aplique y utilice el método h-CLAT en el laboratorio. A continuación se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del método h-CLAT, que comprende dos etapas: *ensayo de determinación de la dosis y medición de la expresión de los marcadores CD86/CD54*.

Preparación de las células

10. Para llevar a cabo el método h-CLAT debe utilizarse la línea celular de la leucemia monocítica humana, THP-1. Se recomienda que las células (TIB-202™) se obtengan de un banco de células adecuado, como la American Type Culture Collection.
11. Se cultivan células THP-1, a 37 °C, en atmósfera humidificada y con un 5 % de CO₂, en medio RPMI-1640, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), 2-mercaptoetanol 0,05 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Puede evitarse el uso de penicilina y de estreptomicina en el medio de cultivo. Sin embargo, en tal caso, los usuarios deben verificar que la ausencia de antibióticos en el medio de cultivo no influye en los resultados, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 1.2. En cualquier caso, para minimizar el riesgo de contaminación, deben seguirse buenas prácticas de cultivo celular, independientemente de la presencia o no de antibióticos en el medio de cultivo celular. Las células THP-1 se siembran sistemáticamente cada 2-3 días a una densidad de 0,1 a 0,2 × 10⁶ células/ml. Deben mantenerse a densidades de 0,1 a 1,0 × 10⁶ células/ml. Antes de utilizarse para el ensayo, las células deben ser objeto de un control de reactividad, que ha de realizarse utilizando los testigos positivos, 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (n.º CAS 97-00-7, pureza ≥ 99 %) y sulfato de níquel (NiSO₄) (n.º CAS 10101-97-0, pureza ≥ 99 %) y el testigo negativo, ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %), dos semanas después de la descongelación. Tanto el DNCB como el NiSO₄ deben producir una respuesta positiva de los marcadores de superficie celular CD86 y CD54, y el LA debe producir una respuesta negativa de ambos tipos de marcadores. Solo se pueden utilizar para el ensayo las células que hayan superado el control de reactividad. Las células pueden propagarse hasta dos meses después de la descongelación. El número de pases no debe ser superior a 30. El control de reactividad debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 20 a 24.
12. Para el ensayo, se siembran células THP-1 a una densidad de 0,1 × 10⁶ células/ml o 0,2 × 10⁶ células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 72 horas o durante 48 horas,

respectivamente. Es importante que la densidad celular en el matraz de cultivo justo después del período de precultivo sea lo más constante posible en cada experimento (utilizando una de las dos condiciones de precultivo descritas anteriormente), ya que la densidad celular en el matraz de cultivo justo después del precultivo podría afectar a la expresión de CD86/CD54 inducida por alérgenos (19). En el día del ensayo, se toman células del matraz de cultivo y se suspenden con medio de cultivo fresco a la concentración de 2×10^6 células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa de fondo plano de 24 pocillos con $500 \mu\text{l}$ (1×10^6 células/pocillo) o una placa de fondo plano de 96 pocillos con $80 \mu\text{l}$ ($1,6 \times 10^5$ células/pocillo).

Ensayo de determinación de la dosis

13. Se lleva a cabo un *ensayo de determinación de la dosis* para determinar la CV75, que es la concentración del producto problema que da el 75 % de viabilidad celular (CV) en comparación con el control del disolvente/vehículo. El valor de CV75 se utiliza para determinar la concentración de productos problema utilizada en la medición de la expresión de CD86/CD54 (véanse los puntos 20-24).

Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo

14. Los productos problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Para el método h-CLAT, los productos problema se disuelven o dispersan de forma estable (véase también el punto 4) en solución salina o medio, como primeras opciones de disolvente/vehículo, o en dimetilsulfóxido (DMSO, ≥ 99 % de pureza) como segunda opción de disolvente/vehículo si el producto problema no es soluble o no forma una dispersión estable en los dos disolventes/vehículos anteriores, hasta obtener las concentraciones finales de 100 mg/ml (en solución salina o medio) o 500 mg/ml (en DMSO). Podrán utilizarse otros disolventes/vehículos distintos de los descritos anteriormente si se presenta una justificación científica suficiente. Debe tenerse en cuenta la estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo final.
15. A partir de las soluciones madre de 100 mg/ml (en solución salina o en medio) o 500 mg/ml (en DMSO) de los productos problema, deben efectuarse las siguientes diluciones:
 - Con solución salina o medio como disolvente/vehículo: Se preparan ocho soluciones madre (ocho concentraciones), mediante diluciones a la mitad en serie utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Estas soluciones madre se diluyen posteriormente 50 veces en medio de cultivo (soluciones de trabajo). Si la concentración final máxima en la placa de $1\ 000 \mu\text{g/ml}$ no es tóxica, debe volver a determinarse la concentración máxima realizando un nuevo ensayo de citotoxicidad. La concentración final en la placa no debe

exceder de 5 000 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable en la solución salina o salina.

- Con DMSO como disolvente/vehículo: Se preparan ocho soluciones madre (ocho concentraciones), mediante diluciones a la mitad en serie utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Estas soluciones madre se diluyen posteriormente 250 veces en medio de cultivo (soluciones de trabajo). la concentración final en la placa no debe exceder de 1 000 $\mu\text{g/ml}$, incluso aunque esta concentración no sea tóxica.

Las soluciones de trabajo se utilizan finalmente para la exposición añadiendo un volumen igual de solución de trabajo al volumen de la suspensión de células THP-1 en la placa (véase también el punto 17) para lograr otra dilución a la mitad (normalmente, el intervalo final de concentraciones en la placa es de 7,81-1 000 $\mu\text{g/ml}$).

16. El control del disolvente o vehículo utilizado en el método h-CLAT es el medio de cultivo [en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable (véase el punto 4), con medio o con solución salina] o el DMSO (en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable en DMSO), y se somete a ensayo a una única concentración final en la placa del 0,2 %. Se somete al mismo proceso de dilución que se describe en el punto 15 para las soluciones de trabajo.

Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo

17. El medio de cultivo o las soluciones de trabajo descritas en los puntos 15 y 16 se mezclan 1 : 1 (v/v) con las suspensiones celulares preparadas en la placa de fondo plano de 24 pocillos o de 96 pocillos (véase el punto 12). A continuación, las placas tratadas se incuban durante $24 \pm 0,5$ horas a 37°C con 5 % de CO_2 . Deben tomarse precauciones para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre pocillos por productos problema, por ejemplo tapando la placa antes de la incubación con los productos problema (20).

Tinción con yoduro de propidio (PI)

18. Tras $24 \pm 0,5$ horas de exposición, las células se transfieren a tubos de muestreo y se recogen por centrifugación. Los sobrenadantes se desechan y las células restantes se vuelven a suspender con 200 μl (en caso de 96 pocillos) o 600 μl (en caso de 24 pocillos) de una solución salina amortiguadora de fosfato que contenga un 0,1 % de seroalbúmina bovina (solución amortiguadora de tinción). Se transfieren 200 μl de suspensión celular a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (en caso de 96 pocillos) o a un microtubo (en el caso de 24 pocillos) y se lavan dos veces con 200 μl (en caso de 96 pocillos) o 600 μl (en caso de 24 pocillos) de solución amortiguadora de tinción. Por último, las células se vuelven a suspender en solución amortiguadora de tinción (p. ej., 400 μl) y se añade la solución de PI (p. ej., 20 μl) (p. ej., la concentración final de PI es de 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Pueden

utilizarse otros marcadores de citotoxicidad, tales como la 7-aminoactinomicina D (7-AAD), azul tripano u otros, si se puede demostrar que las tinciones alternativas ofrecen resultados similares a los del PI, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 1.2.

Medición de la citotoxicidad por citometría de flujo y estimación del valor de CV75

19. La absorción del PI se analiza mediante citometría de flujo con el canal de medición FL-3. Se miden en total 10 000 células vivas (negativas para el PI). La viabilidad celular puede calcularse con la siguiente ecuación por el programa de análisis del citómetro. Cuando la viabilidad celular es baja, deben medirse hasta 30 000 células, incluidas las células muertas. Como alternativa, también es posible medir los datos durante un minuto tras el inicio del análisis.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células medidas}} \times 100$$

El valor de CV75 (véase el punto 13), es decir, la concentración que muestra el 75 % de supervivencia de las células THP-1 (25 % de citotoxicidad), se calcula mediante interpolación semilogarítmica con la siguiente ecuación:

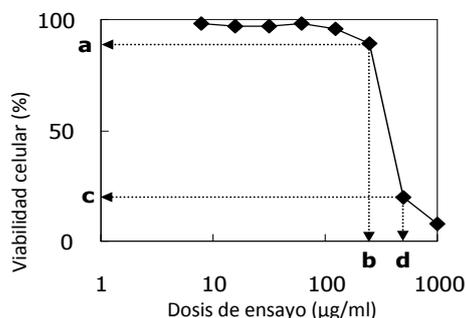
$$\text{Lg CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Lg}(b) - (75-a) \times \text{Lg}(d)}{a-c}$$

donde:

a es el valor mínimo de viabilidad celular superior al 75 %;

c es el valor máximo de viabilidad celular inferior al 75 %;

b y d son las concentraciones que muestran los valores de viabilidad celular a y c, respectivamente.



Pueden utilizarse otros métodos para obtener el valor de CV75 siempre que se demuestre que esto no afecta a los resultados (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia).

Medición de la expresión de CD86/CD54

Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo

20. El disolvente o vehículo apropiado (solución salina, medio o DMSO; véase el punto 14). Los productos problema se diluyen primero a la concentración correspondiente a 100 veces (en caso de solución salina) o 500 veces (en caso de DMSO) la concentración $1,2 \times CV75$ determinada en el *ensayo de determinación de la dosis* (véase el punto 19). Si no puede determinarse la CV75 (es decir, si no se observa suficiente citotoxicidad en el *ensayo de determinación de la dosis*), debe utilizarse como concentración inicial la concentración más elevada soluble o dispersa de forma estable del producto problema preparado con cada disolvente o vehículo. Téngase en cuenta que la concentración final en la placa no debe superar los 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (en el caso de la solución salina o del medio) o los 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (en el caso del DMSO). A continuación, se utilizan diluciones en serie de factor 1,2 con el disolvente o vehículo correspondiente para obtener las soluciones madre [ocho concentraciones comprendidas entre $100 \times 1,2 \times CV75$ y $100 \times 0,335 \times CV75$ (con solución salina o medio) o entre $500 \times 1,2 \times CV75$ y $500 \times 0,335 \times CV75$ (con DMSO)] que deben someterse a ensayo con el método h-CLAT (véase en el protocolo DB-ALM, n.º 158 un ejemplo de sistema de dosificación). Las soluciones madre se diluyen posteriormente 50 veces (en caso de solución salina o medio) o 250 veces (en caso de DMSO) en el medio de cultivo (soluciones de trabajo). Estas soluciones de trabajo se utilizan finalmente para la exposición con otra dilución final a la mitad en la placa. Si los resultados no cumplen los criterios de aceptación descritos en los puntos 29 y 30 respecto a la viabilidad celular, podrá repetirse el *ensayo de determinación de la dosis* para determinar el valor de CV75 más precisamente. Téngase en cuenta que para la medición de la expresión de CD86/CD54 se pueden utilizar solo placas de 24 pocillos.
21. El control del disolvente/vehículo se prepara como se describe en el punto 16. El testigo positivo utilizado en el método h-CLAT es el DNCB (véase el punto 11); se preparan las soluciones madre en DMSO y se diluyen como se describe en el punto 20 respecto a las soluciones madre. El DNCB debe utilizarse como testigo positivo para la *medición de la expresión de CD86/CD54* en una única concentración final en la placa (por lo general, 4,0 $\mu\text{g/ml}$). Para obtener una concentración de 4,0 $\mu\text{g/ml}$ de DNCB en la placa, se prepara una solución madre de 2 mg/ml de DNCB en DMSO, y se diluye después 250 veces con medio de cultivo hasta conseguir una solución de trabajo de 8 $\mu\text{g/ml}$. Alternativamente, la CV75 del DNCB, que se determina en cada laboratorio, también podría utilizarse como concentración de testigo positivo. Podrán utilizarse otros testigos positivos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas. Respecto a los testigos positivos, la concentración final única en la placa no debe superar los 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (en el caso de la solución salina o del medio) o los 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (en el caso del DMSO). Los criterios de aceptación de tandas son los mismos que los descritos para el

producto problema (véase el punto 29), excepto en lo relativo al último criterio de aceptación, puesto que el testigo positivo se somete a ensayo a una sola concentración.

Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo

22. Respecto a cada producto problema y sustancia testigo, se necesita un solo experimento para obtener una asignación. Cada experimento consiste en al menos dos tandas independientes para la *medición de la expresión de CD86/CD54* (véanse los puntos 26-28). Cada tanda independiente se llevará a cabo en un día diferente o el mismo día, siempre que, respecto a cada una de las tandas: a) se preparen soluciones madre y soluciones de trabajo nuevas e independientes del producto problema y de los anticuerpos, y b) se utilicen células recolectadas de forma independiente (es decir, se recogen las células de distintos matraces de cultivo); no obstante, las células pueden proceder del mismo pase. Los productos problema y las sustancias testigo preparados como soluciones de trabajo (500 μ l) se mezclan con 500 μ l de células suspendidas (1×10^6 células) en la proporción 1 : 1, y las células se incuban durante $24 \pm 0,5$ horas, como se describe en los puntos 20 y 21. En cada tanda, bastará una sola réplica de cada concentración del producto problema y de la sustancia testigo, ya que la clasificación se obtiene de al menos dos tandas independientes.

Tinción y análisis celular

23. Después de $24 \pm 0,5$ horas de exposición, se transfieren las células de la placa de 24 pocillos a los tubos de muestreo, se recogen por centrifugación y, a continuación, se lavan dos veces con 1 ml de solución amortiguadora de tinción (en caso necesario, pueden aplicarse más etapas de lavado). Tras su lavado, las células se bloquean con 600 μ l de solución de bloqueo [solución amortiguadora de tinción con 0,01 % (p/v) de globulina (fracciones II y III de Cohn, humanas; SIGMA, # G2388-10G o equivalente)] y se incuban a 4 °C durante 15 min. Tras su bloqueo, las células se dividen en tres alícuotas de 180 μ l en una placa de fondo redondo de 96 pocillos o microtubo.
24. Tras su centrifugación, las células se tiñen con 50 μ l de anticuerpos anti-CD86, anti-CD54 marcados con FITC o IgG1 (isotipo) de ratón a 4 °C durante 30 min. Los anticuerpos descritos en el protocolo n.º 158 de la DB-ALM de h-CLAT (18) deben utilizarse mediante dilución 3 : 25 v/v [para CD86 (BD-PharMingen, # 555657; Clone: Fun-1)] o 3 : 50 v/v [para CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)] con solución amortiguadora de tinción. Los desarrolladores del ensayo definieron estos factores de dilución de los anticuerpos como los que proporcionan la mejor relación entre señal y ruido. Según la experiencia de los desarrolladores del ensayo, la intensidad de la fluorescencia de los anticuerpos suele ser coherente entre los diferentes lotes. No obstante, los usuarios pueden considerar la valoración de los anticuerpos en las condiciones de su propio laboratorio a fin de determinar las mejores concentraciones que han de utilizar.

Podrán utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromo antiCD86 y/o antiCD54 si se puede demostrar que proporcionan resultados similares a los de anticuerpos conjugados con FITC, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para demostrar la competencia que se indican en el apéndice 1.2. Cabe señalar que la modificación del clon o del proveedor de los anticuerpos, tal como se recogen en el protocolo DB-ALM n.º 158 del h-CLAT (18), puede afectar a los resultados. Después de lavarlas dos veces o más con 150 µl de solución amortiguadora de tinción, las células se vuelven a suspender en esta solución amortiguadora de tinción (p. ej., 400 µl) y en la solución de PI (p. ej., 20 µl para obtener una concentración final de 0,625 µg/ml) o en la solución de otro marcador de citotoxicidad (véase el punto 18). Se analizan los niveles de expresión de CD86 y CD54, y la viabilidad celular, utilizando la citometría de flujo.

DATOS E INFORME

Evaluación de los datos

25. La expresión de CD86 y CD54 se analiza mediante citometría de flujo con el canal de medida FL-1. Sobre la base de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia (MFI, *mean fluorescence intensity*), la intensidad de la fluorescencia relativa (RFI, *relative fluorescence intensity*) de CD86 y CD54 en el caso de las células testigo positivo (ctrl) y de las células tratadas con producto se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$RFI = \frac{MFI \text{ células tratadas producto} - MFI \text{ células testigo isotipo tratadas producto}}{MFI \text{ células ctrl tratadas disolvente/vehículo} - MFI \text{ células ctrl isotipo tratadas disolvente/vehículo}} \times 100$$

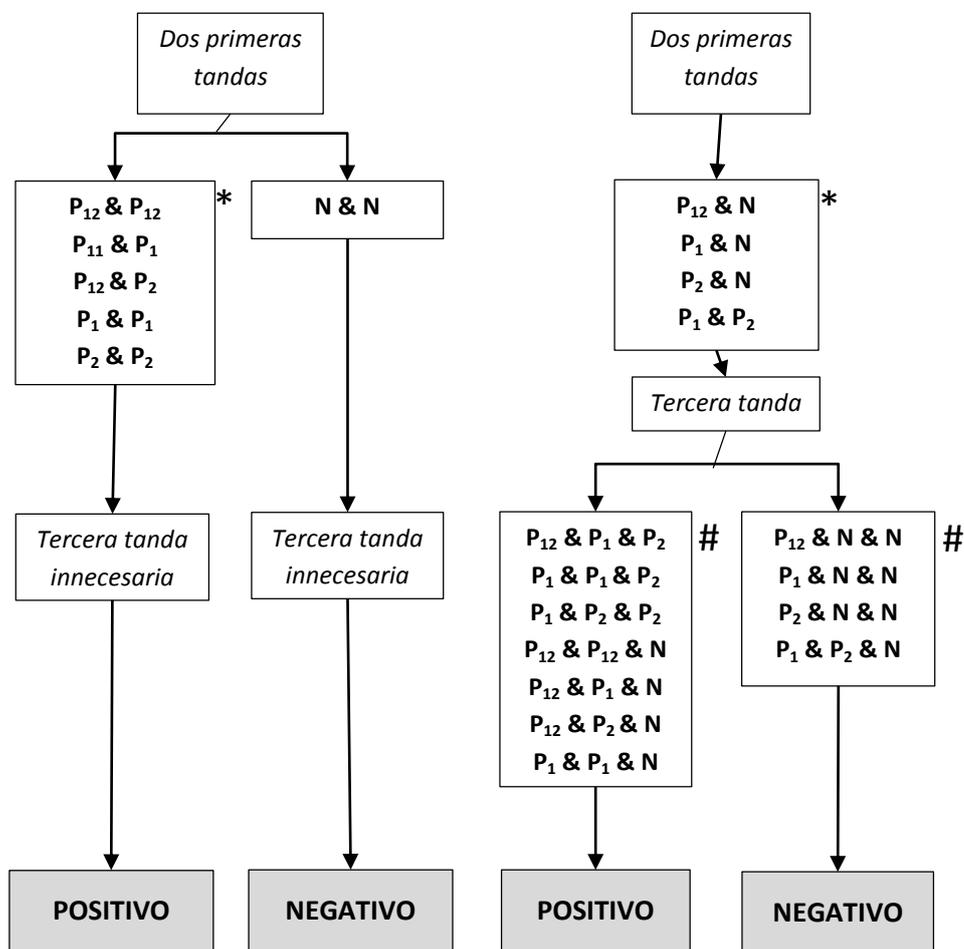
La viabilidad celular de las células testigo de isotipo (ctrl) [que se tiñen con anticuerpos IgG1 (isotipo) de ratón] se calcula también con arreglo a la ecuación descrita en el punto 19.

Modelo de asignación

26. Para la medición de la expresión de *CD86/CD54*, cada producto problema se somete al menos a dos tandas independientes a fin de obtener una única asignación (POSITIVA o NEGATIVA). La asignación del h-CLAT se considera POSITIVA si en 2 de 2, o en al menos 2 de 3, tandas independientes se cumple al menos una de las condiciones siguientes; de lo contrario, la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA (figura 1):
- La RFI del CD86 es igual o superior al 150 % a cualquier concentración estudiada (con viabilidad celular ≥ 50 %);
 - La RFI del CD54 es igual o superior al 200 % a cualquier concentración estudiada (con viabilidad celular ≥ 50 %);
27. Sobre la base de lo anterior, si las dos primeras tandas son positivas para el CD86 y/o son positivas para el CD54, la asignación del h-CLAT se considera POSITIVA y no es

necesario realizar una tercera tanda. Del mismo modo, si las dos primeras tandas son negativas para ambos marcadores, la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA (teniendo debidamente en cuenta lo dispuesto en el punto 30) sin necesidad de una tercera tanda. Sin embargo, si las dos primeras tandas no son concordantes en relación al menos con uno de los marcadores (CD54 o CD86), se necesita una tercera tanda y la asignación final se basará en el resultado mayoritario de las tres tandas individuales (es decir, 2 de 3). A este respecto, hay que señalar que, si se llevan a cabo dos tandas independientes y una es solo positiva en el caso del CD86 (en lo sucesivo, P_1) y la otra es solo positiva en el caso del CD54 (en lo sucesivo P_2), se requiere una tercera tanda. Si esta tercera tanda es negativa para ambos marcadores (en lo sucesivo, N), la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA. Por otra parte, si la tercera tanda es positiva para uno de los dos marcadores (P_1 o P_2) o para ambos marcadores (en lo sucesivo, P_{12}), la asignación del h-CLAT se considera POSITIVA.

Figura 1: Modelo de asignación utilizado en el método h-CLAT. Las asignaciones del h-CLAT deben interpretarse en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general.



P_1 : tanda con solo CD86 positivo; P_2 : tanda con solo CD54 positivo; P_{12} : tanda con CD86 y CD54 positivos; N: tanda sin CD86 ni CD54 positivos.

* Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las dos primeras tandas, con independencia del orden en que puedan obtenerse.

Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las tres tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las dos primeras, indicadas en el recuadro superior, pero no reflejan el orden en que puedan obtenerse.

28. En el caso de los productos problema clasificados como POSITIVOS con el h-CLAT, opcionalmente se pueden determinar dos valores de concentraciones efectivas (CE), el valor de CE150 para el CD86 y el valor de CE200 para el CD54, es decir, la concentración a la que los productos problema inducen una RFI de 150 o de 200. Estos valores de CE podrían contribuir a la evaluación de la potencia sensibilizante (9) cuando se utilicen en

enfoques integrados, como los enfoques IATA (4) (5) (6) (7) (8). Pueden calcularse con las siguientes ecuaciones:

$$CE150 \text{ (para CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$CE200 \text{ (para CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

donde:

A_{conc} es la concentración más baja, en $\mu\text{g/ml}$, con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54);

B_{conc} es la concentración más alta, en $\mu\text{g/ml}$, con $\text{RFI} < 150$ (CD86) o 200 (CD54);

A_{RFI} es la RFI a la concentración más baja con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54);

B_{RFI} es la RFI a la concentración más alta con $\text{RFI} < 150$ (CD86) o 200 (CD54).

Con el fin de obtener más precisamente los valores de CE150 y CE200, pueden ser necesarias tres tandas independientes para la *medición de la expresión de CD86/CD54*. Los valores finales de CE150 y CE200 se determinan a continuación como el valor mediano de las CE calculadas con las tres tandas independientes. Si solo dos de las tres tandas independientes cumplen los criterios de positividad (véanse los puntos 26 - 27), se adopta el valor de CE150 o CE200 más alto de los dos valores calculados.

Criterios de aceptación

29. Cuando se use el método h-CLAT deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación (22) (27).
- Las viabilidades celulares de los controles de disolvente o vehículo y medio deben ser superiores al 90 %.
 - En el control del disolvente o vehículo, los valores de RFI tanto del CD86 como del CD54 no deben superar los criterios positivos (CD86 con $\text{RFI} \geq 150$ % y CD54 con $\text{RFI} \geq 200$ %). Los valores de RFI del control del disolvente o vehículo se calculan mediante la fórmula descrita en el punto 25 [“MFI del producto” debe sustituirse por “MFI del disolvente/vehículo” y “MFI del disolvente/vehículo” debe sustituirse por “MFI del control (medio)].
 - Tanto en los controles de medio como en los de disolvente o vehículo, la proporción de la MFI tanto del CD86 como del CD54 respecto a la del testigo de isotipo deberá ser > 105 %.
 - En el testigo positivo (DNCB), los valores de RFI tanto del CD86 como del CD54 deben cumplir los criterios positivos (CD86 con $\text{RFI} \geq 150$ y CD54 con $\text{RFI} \geq 200$) y la viabilidad celular debe ser superior al 50 %.

- En el caso del producto problema, la viabilidad celular debe ser superior al 50 % en al menos cuatro concentraciones sometidas a ensayo en cada tanda.
30. Los resultados negativos son aceptables únicamente para los productos problema que presenten una viabilidad celular inferior al 90 % en la concentración más alta ensayada (es decir, $1,2 \times CV75$ según el sistema de diluciones en serie descrito en el punto 20). Si la viabilidad celular a $1,2 \times CV75$ es igual o superior al 90 %, debe descartarse el resultado negativo. En tal caso, se recomienda intentar afinar la selección de la dosis repitiendo la determinación de la CV75. Hay que señalar que, cuando se utiliza como concentración máxima de ensayo de un producto problema la concentración de 5 000 $\mu\text{g/ml}$ en solución salina (o en medio o en otros disolventes/vehículos), la de 1 000 $\mu\text{g/ml}$ en DMSO o la mayor concentración soluble, se puede aceptar un resultado negativo aunque la viabilidad celular sea superior al 90 %.

Informe del ensayo

31. 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;
- Aspecto físico, log Kow, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;
- 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);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

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;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

- Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Testigos y controles

Testigo positivo

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Aspecto físico, log K_{ow} , hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;
- 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);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

Testigo negativo y controles del disolvente o vehículo

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números 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.;
- Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos controles de disolvente o vehículo distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Condiciones del ensayo

- Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;
- Descripción del ensayo utilizado;
- Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, instalación en la que se ha obtenido);
- Citometría de flujo utilizada (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, la globulina, los anticuerpos y el marcador de citotoxicidad utilizados;
- Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en la realización del ensayo mediante el ensayo de sustancias destinadas a tal fin, y procedimiento utilizado para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo, por ejemplo datos de testigos históricos o datos históricos de controles de la reactividad.

Criterios de aceptación del ensayo

- Valores de viabilidad celular, de MFI y de RFI obtenidos con el control del disolvente o vehículo en comparación con los intervalos de aceptación;
- Valores de viabilidad celular y de RFI obtenidos con el testigo positivo en comparación con los intervalos de aceptación;
- Viabilidad celular de todas las concentraciones sometidas a ensayo del producto problema.

Procedimiento de ensayo

- Número de tandas utilizadas;
- Concentraciones del producto problema, tiempo de aplicación y de exposición utilizado (si es diferente del recomendado);
- Duración de la exposición (si es diferente de la recomendada);
- Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

Resultados

- Tabulación de los datos, incluidos la CV75 (si procede), los distintos valores de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, de la RFI y de la viabilidad celular, los valores de CE150/CE200 (si procede) obtenidos con el producto problema y con el testigo positivo en cada tanda, y una indicación de la calificación del producto problema según el modelo de asignación;
- Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

Discusión de los resultados

- Discusión de los resultados obtenidos con el método h-CLAT;
- Consideración de los resultados del ensayo en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Puede consultarse en: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Puede consultarse en: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Puede consultarse en: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París (Francia), 2005, 96 pp.
- (22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment, No. 168. Disponible en: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Quinta edición revisada. Nueva York & 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
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Apéndice 1.1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados del 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 (21).

Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*): Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (22).

Producto: Sustancia o mezcla.

CV75: La concentración estimada que muestra una viabilidad celular del 75 %.

CE150: Concentraciones que muestran un valor de RFI de 150 en la expresión del CD86.

CE200: Concentraciones que muestran un valor de RFI de 200 en la expresión del CD54.

Citometría de flujo: Técnica de citometría en la que las células suspendidas en un fluido fluyen una a una a través de un foco de luz excitadora, que se dispersa en patrones característicos según las células y sus componentes; las células están marcadas frecuentemente con marcadores fluorescentes, de modo que la luz se absorbe primero y, a continuación, se emite con una frecuencia modificada.

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.

IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*): Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

Control del medio: Réplica 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 de control para determinar si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

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

Sustancias 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.

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.

Pre-haptenos: Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica.

Pro-haptenos: Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

Intensidad de fluorescencia relativa (RFI): Valores relativos de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia (MFI) de las células tratadas con el producto en comparación con la MFI de las células tratadas con disolvente o vehículo.

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 ensayo (21).

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 y la repetibilidad intralaboratorios (21).

Tanda: Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos 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 (21).

Solución amortiguadora de tinción: Solución salina amortiguadora de fosfato con un 0,1 % de seroalbúmina bovina.

Control del disolvente o vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes

de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control 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 ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (21).

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.

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 (23).

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

Ensayo válido: 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 ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (21).

Apéndice 1.2

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención con el h-CLAT de la clasificación prevista de las diez sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores de CV75, CE150 y CE200 que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia. Estas sustancias de la prueba de la competencia se seleccionaron a fin de representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el método h-CLAT. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el método h-CLAT (3) (14).

Cuadro 1: Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el método h-CLAT

Sustancias para la competencia	N.º CAS	Estado físico	Asignación <i>in vivo</i> ¹	Intervalo de referencia de la CV75 en µg/ml ²	Resultados con el h-CLAT sobre el CD86 (intervalo de referencia de la CE150 en µg/ml) ²	Resultados con el h-CLAT sobre el CD54 (intervalo de referencia de la CE200 en µg/ml) ²
2,4-Dinitroclorobenceno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilendiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (fuerte)	5-95	Positivo (< 40)	Negativo (> 1,5) ³
Sulfato de níquel	10101-97-0	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-500	Positivo (< 100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-400	Negativo (> 10) ³	Positivo (10-140)
R(+)-Limoneno	5989-27-5	Líquido	Sensibilizante (débil)	> 20	Negativo (> 5) ³	Positivo (< 250)
Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Sólido	Sensibilizante (débil)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Líquido	No sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Líquido	No sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	No sensibilizante	1500-5000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido 4-aminobenzoico	150-13-0	Sólido	No sensibilizante	> 1 000	Negativo (> 1 000)	Negativo (> 1 000)

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

¹ La asignación de peligro (y de potencia) *in vivo* se basa en datos del LLNA (14). La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (24).

² Sobre la base de los valores históricos observados (13) (25).

³ Históricamente, la mayoría de resultados negativos se ha obtenido con este marcador y, por tanto, se espera sobre todo un resultado negativo. El intervalo indicado se definió sobre la base de los escasos resultados positivos históricos observados. En caso de que se obtenga un resultado positivo, el valor de CE debe situarse dentro del intervalo de referencia notificado.

Apéndice 2

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR U937 (U-SENS™)

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. El ensayo U-SENS™ cuantifica el cambio en la expresión de un marcador de superficie celular asociado al proceso de activación de los monocitos y de las células dendríticas (DC) (es decir, el CD86), en la línea celular del linfoma histiocítico humano U937, tras la exposición a sensibilizantes (1). Los niveles de expresión medidos del marcador de superficie celular CD86 en la línea celular U937 se utilizan a continuación para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.
2. El ensayo U-SENS™ se ha evaluado en un estudio de validación (2) coordinado por L'Oréal y objeto posteriormente de revisión por pares independientes en el Comité Científico Consultivo (ESAC) del laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (EURL ECVAM) (3). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, el EURL ECVAM recomendó que el U-SENS™ se utilizara como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado (4). En su documento de orientación sobre la información de los enfoques estructurados relativos a la integración de datos y a las distintas fuentes de información utilizadas en los enfoques IATA en relación con la sensibilización cutánea, la OCDE examina actualmente una serie de estudios de casos que describen diferentes estrategias de ensayo y modelos de asignación. Uno de los diferentes enfoques definidos se basa en el ensayo U-SENS (5). En otras citas de la bibliografía (4) (5) (7) también se incluyen ejemplos de uso de los datos del ensayo U-SENS™ en combinación con otra información, incluidos datos históricos y datos humanos válidos ya existentes (6).
3. Se ha demostrado que el ensayo U-SENS™ puede transferirse a laboratorios con experiencia en técnicas de cultivo celular y análisis de citometría de flujo. El nivel de reproducibilidad de las asignaciones que cabe esperar del ensayo es del orden del 90 % y del 84 % dentro de un laboratorio y entre laboratorios, respectivamente (8). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (8) y otros estudios publicados (1) indican en general que, en comparación con los resultados del LLNA, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 86 % (N = 166), con una sensibilidad del 91 % (118/129) y una especificidad del 65 % (24/37). En comparación con los resultados

obtenidos con seres humanos, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 77 % (N = 101), con una sensibilidad del 100 % (58/58) y una especificidad del 47 % (20/43). Es más probable que las asignaciones negativas falsas obtenidas con el ensayo U-SENS™ en comparación con el LLNA afecten a los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1) (8) (9). En conjunto, esta información indica la utilidad del ensayo U-SENS™ para contribuir a la identificación de los peligros de sensibilización cutánea. Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el U-SENS™ utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el ensayo U-SENS™ es aplicable a productos problema (incluidos los ingredientes de cosméticos, como los conservantes, tensioactivos, sustancias activas, colorantes, etc.) que abarcan una variedad de grupos funcionales orgánicos, de propiedades fisicoquímicas, de potencia de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y el espectro de mecanismos de reacción de los que se sabe que están asociados con la sensibilización cutánea (como, por ejemplo, aceptor de Michael, formación de bases de Schiff, agentes de transferencia de grupos acilo, sustitución nucleofílica bi-molecular [SN2], o sustitución nucleofílica aromática [SNAr]) (1) (8) (9) (10). El ensayo U-SENS™ es aplicable a los productos problema que son solubles o que forman una dispersión estable (es decir, un coloide o una suspensión en la que el producto problema no sedimenta ni se separa del disolvente o vehículo para formar distintas fases) en un disolvente o vehículo adecuado (véase el punto 13). Los productos que en el conjunto de datos figuran como pre-haptenos (es decir, sustancias que se activan por oxidación) o pro-haptenos (es decir, sustancias que requieren activación enzimática, por ejemplo mediante enzimas P450) fueron clasificados correctamente por el ensayo U-SENS™ (1) (10). Las sustancias que alteran la membrana pueden dar lugar a resultados positivos falsos debido a un aumento inespecífico de la expresión del CD86, ya que eran tensioactivos tres de los siete falsos positivos en relación con la clasificación de referencia *in vivo* (1). Tales resultados positivos con los tensioactivos deben considerarse con precaución, mientras que los resultados negativos con los tensioactivos podrían seguir utilizándose para apoyar la identificación del producto problema como no sensibilizante. Los productos problema fluorescentes pueden evaluarse

con el ensayo U-SENS™ (1); sin embargo, los productos problema muy fluorescentes que emiten a la misma longitud de onda que el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o que el yoduro de propidio (PI) pueden interferir con la detección por citometría de flujo y, por tanto, no pueden evaluarse correctamente utilizando anticuerpos conjugados con el FITC (posibles falsos negativos) ni con el PI (no puede medirse la viabilidad). En tal caso, pueden utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromos u otros marcadores de citotoxicidad, según corresponda, siempre que se demuestre que proporcionan resultados similares a los de los anticuerpos marcados con FITC o PI (véase el punto 18), por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. A la luz de lo anterior, los resultados positivos obtenidos con tensioactivos y los resultados negativos obtenidos con fluorescentes fuertes deben interpretarse en el contexto de las limitaciones indicadas y junto con otras fuentes de información en el marco de los enfoques IATA. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del ensayo U-SENS™ a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este ensayo con tales categorías específicas.

5. Tal como se ha descrito anteriormente, el ensayo U-SENS™ sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. No obstante, podrá contribuir también a la evaluación de la potencia sensibilizante cuando se utilice en enfoques integrados, como los enfoques IATA. Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos con seres humanos, para determinar de qué modo los resultados del ensayo U-SENS™ pueden informar sobre la evaluación de la potencia.
6. En el apéndice 2.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. El U-SENS™ es un ensayo *in vitro* que cuantifica los cambios de la expresión del marcador de superficie celular CD86 en las células U937 de la línea celular del linfoma histiocítico humano, tras una exposición de 45 ± 3 horas al producto problema. El marcador de superficie CD86 es un marcador típico de la activación de U937. Se sabe que el CD86 es una molécula coestimuladora que puede imitar la activación monocítica, la cual desempeña un papel fundamental en la estimulación de las células T. Los cambios en la expresión del marcador de superficie celular CD86 se miden recurriendo a la citometría de flujo tras la tinción celular normalmente mediante anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). También se lleva a cabo simultáneamente una medición de la citotoxicidad (p. ej., utilizando PI) con el fin de evaluar si a concentraciones subcitotóxicas se produce un incremento de la expresión del marcador de superficie celular CD86. Se calcula el índice de estimulación (IE) del marcador de superficie celular CD86 en

comparación con el control del disolvente o de vehículo y se utiliza en el modelo de asignación (véase el punto 19), a fin de justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

8. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el apéndice 2.2, de conformidad con las buenas prácticas de los métodos *in vitro* (11). Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 11) y con los testigos positivos y los controles del disolvente o vehículo (véanse los puntos 15-16), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

PROCEDIMIENTO

9. Este ensayo se basa en el protocolo n.º 183 de servicio de la base de datos de U-SENS™ sobre métodos alternativos a la experimentación con animales (DB-ALM) (12). Deben emplearse procedimientos normalizados de trabajo (PNT) a la hora de aplicar y utilizar el ensayo U-SENS™ en el laboratorio. Puede utilizarse un sistema automatizado para llevar a cabo el ensayo U-SENS™, si puede demostrarse que proporciona resultados similares, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. A continuación se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del ensayo U-SENS™.

Preparación de las células

10. Para llevar a cabo el ensayo U-SENS™ debe utilizarse la línea celular del linfoma histiocítico humano, U937 (13). Las células (clon CRL1593.2) deben obtenerse de un banco de células adecuado, como la American Type Culture Collection.
11. Se cultivan células U937 a 37 °C, en atmósfera humidificada y con un 5 % de CO₂, en medio RPMI-1640 complementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se hace un pase de las células U937 sistemáticamente cada 2-3 días a una densidad de 1,5 a 3 × 10⁵ células/ml, respectivamente. La densidad celular no debe superar el valor de 2 × 10⁶ células/ml y la viabilidad celular medida mediante la exclusión del azul tripano debe ser ≥ 90 % (no debe aplicarse al primer pase después de la descongelación). Antes de utilizarlos para el ensayo, cada lote de células, FCS o anticuerpos deben ser objeto de un

control de reactividad. El control de reactividad de las células debe realizarse utilizando el testigo positivo, ácido picrilsulfónico (ácido 2,4,6-trinitro-bencenosulfónico, TNBS) (n.º CAS 2508-19-2, ≥ 99 % de pureza), y el testigo negativo, ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, ≥ 85 % de pureza), al menos una semana después de la descongelación. En el control de reactividad, se deben someter a ensayo seis concentraciones finales de cada uno de los dos testigos (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$, y LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). El TNBS solubilizado en medio completo debe dar una respuesta del CD86 positiva y relacionada con la concentración (p. ej., cuando una concentración positiva, con IE de CD86 ≥ 150 , va seguida de una concentración con un aumento del IE de CD86), y el LA solubilizado en medio completo debe dar una respuesta del CD86 negativa (véase el punto 21). Solo se puede utilizar para el ensayo el lote de células que haya superado dos veces el control de reactividad. Las células pueden propagarse hasta siete semanas después de la descongelación. El número de pases no debe ser superior a 21. El control de reactividad debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 18 a 22.

12. Para el ensayo, se siembran células U937 a una densidad de 3×10^5 células/ml o 6×10^5 células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 2 días o durante 1 día, respectivamente. Podrán utilizarse otras condiciones de precultivo si se presenta una justificación científica suficiente y si puede demostrarse que proporcionan resultados similares, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. En el día del ensayo, se toman células del matraz de cultivo y se suspenden con medio de cultivo fresco a la concentración de 5×10^5 células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 100 μl (densidad celular final de $0,5 \times 10^5$ células/pocillo).

Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo

13. La evaluación de la solubilidad se realiza antes del ensayo. Con este fin, los productos problema se disuelven o se dispersan de forma estable a una concentración de 50 mg/ml en medio completo como disolvente de primera opción o en dimetilsulfóxido (DMSO, ≥ 99 % de pureza) como vehículo/disolvente de segunda opción si el producto problema no es soluble en el disolvente o vehículo de medio completo. Para el ensayo, el producto problema se disuelve hasta una concentración final de 0,4 mg/ml en medio completo si el producto es soluble en este disolvente o vehículo. Si el producto es soluble únicamente en DMSO, se disuelve a una concentración de 50 mg/ml. Podrán utilizarse otros disolventes/vehículos distintos de los descritos anteriormente si se presenta una justificación científica suficiente. Debe tenerse en cuenta la estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo final.

14. Los productos problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Dado que no se realiza un ensayo de determinación de la dosis, para la primera tanda se deben ensayar seis concentraciones finales (1, 10, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$) en el disolvente o vehículo correspondiente, bien en medio completo o bien en DMSO al 0,4 % en medio. Para las tandas siguientes, a partir de las soluciones de los productos problema de 0,4 mg/ml en medio completo o de 50 mg/ml en DMSO, se preparan, al menos cuatro soluciones de trabajo (es decir, al menos cuatro concentraciones), utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Las soluciones de trabajo se utilizan finalmente para el tratamiento añadiendo un volumen igual de suspensión celular U937 (véase el punto 11) al volumen de la solución de trabajo en la placa para lograr una dilución adicional a la mitad (12). Las concentraciones (al menos cuatro concentraciones) para cualquier otra tanda se eligen sobre la base de los distintos resultados de todas las tandas anteriores (8). Las concentraciones finales utilizables son 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 $\mu\text{g/ml}$. La concentración máxima final es de 200 $\mu\text{g/ml}$. En caso de que se observe un valor positivo de CD86 a 1 $\mu\text{g/ml}$, se evalúa entonces a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ para encontrar la concentración del producto problema que no induce al CD86 por encima del umbral positivo. Con cada tanda, se calcula la CE150 (concentración a la que un producto alcanza el umbral positivo de CD86 del 150 %; véase el punto 19) si se observa una relación positiva entre la respuesta del CD86 y la concentración. Cuando el producto problema induzca una respuesta positiva del CD86 no relacionada con la concentración, el cálculo de la CE150 podría no ser pertinente, como se describe en el protocolo n.º 183 de la DB-ALM de U-SENSTM (12). Con cada tanda, se calcula la CV70 (concentración a la que un producto alcanza el umbral de citotoxicidad del 70 %, véase el punto 19) siempre que sea posible (12). Para investigar el efecto de respuesta a la concentración como aumento de CD86, deben elegirse cualesquiera concentraciones de entre las utilizables, repartidas de forma uniforme entre la CE150 (o la mayor concentración no citotóxica negativa respecto al CD86) y la CV70 (o la mayor concentración permitida, es decir, 200 $\mu\text{g/ml}$). Se deben someter a ensayo como mínimo cuatro concentraciones por tanda, con un mínimo de dos concentraciones comunes con las de la tanda o tandas anteriores, con fines comparativos.
15. El control del disolvente o vehículo utilizado en el ensayo U-SENSTM es el medio completo (en el caso de los productos problema solubilizados o dispersos de forma estable en él) (véase el punto 4) o DMSO al 0,4 % en medio completo (en el caso de los productos problema solubilizados o dispersos de forma estable en DMSO).
16. El testigo positivo utilizado en el ensayo U-SENSTM es el TNBS (véase el punto 11), preparado en el medio completo. El TNBS debe utilizarse como testigo positivo para la medición de la expresión de CD86 a una única concentración final en la placa (50 $\mu\text{g/ml}$) que da > 70% de viabilidad celular. Para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de TNBS

en la placa, se prepara una solución madre de TNBS 1 M (es decir, 293 mg/ml) en medio completo, y se diluye después 2 930 veces con medio completo hasta conseguir una solución de trabajo de 100 µg/ml. El ácido láctico (LA, n.º CAS 50-21-5) debe utilizarse como testigo negativo a 200 µg/ml solubilizado en medio completo (a partir de una solución madre de 0,4 mg/ml). En cada placa de cada tanda se preparan tres réplicas del control de medio completo no tratado, del control del disolvente o del vehículo, y de los testigos positivos y negativos (12). Podrán utilizarse otros testigos positivos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas. Los criterios de aceptación de tandas son los mismos que los descritos para el producto problema (véase el punto 12).

Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo

17. El control del disolvente o del vehículo o las soluciones de trabajo descritas en los puntos 14-16 se mezclan 1 : 1 (v/v) con las suspensiones celulares preparadas en la placa de fondo plano de 96 pocillos (véase el punto 12). A continuación, las placas tratadas se incuban durante 45 ± 3 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Antes de la incubación, las placas se sellan con una membrana semipermeable, para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre células tratadas con productos problema (12).

Tinción celular

18. Tras 45 ± 3 horas de exposición, las células se transfieren a una placa de microvaloración con forma de V y se recogen por centrifugación. La interferencia de la solubilidad se define como cristales o gotas observadas al microscopio a las 45 ± 3 horas después del tratamiento (antes de la tinción celular). Los sobrenadantes se desechan y las células restantes se lavan una vez con 100 µl de una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) enfriada con hielo y que contiene un 5 % de suero de ternera fetal (solución amortiguadora de tinción). Tras la centrifugación, se vuelven a suspender las células con 100 µl de solución amortiguadora de tinción y se tiñen con 5 µl (p. ej., 0,25 µg) de anticuerpos anti-CD86 marcados con FITC o IgG1 (isotipo) de ratón a 4 °C durante 30 min protegidas de la luz. Deben utilizarse los anticuerpos descritos en el protocolo n.º 183 de la DB-ALM de U-SENS™ (12) (para CD86: BD-PharMingen, # 555657 Clon: Fun-1, o Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clon: BU63; y para IgG1: BD-PharMingen #555748, o Caltag/Invitrogen # GM4992). Según la experiencia de los desarrolladores del ensayo, la intensidad de la fluorescencia de los anticuerpos suele ser coherente entre los diferentes lotes. Para el ensayo podrán utilizarse otros clones o proveedores de anticuerpos que hayan superado el control de reactividad (véase el punto 11). No obstante, los usuarios pueden considerar la valoración de los anticuerpos en las condiciones de su propio laboratorio a fin de determinar la mejor concentración que han de utilizar. Podrá utilizarse otro sistema de

detección como, p. ej., anticuerpos marcados con fluorocromo antiCD86, si se puede demostrar que proporcionan resultados similares a los de anticuerpos conjugados con FITC, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para demostrar la competencia que se indican en el apéndice 2.2. Después de lavar dos veces con 100 µl de solución amortiguadora de tinción y una vez con 100 µl de PBS enfriada con hielo, se vuelven a suspender las células en PBS enfriada con hielo (por ejemplo, 125 µl en caso de muestras analizadas manualmente tubo por tubo, o 50 µl si se utiliza una placa de automuestreador) y se añade una solución de PI (concentración final de 3 µg/ml). Pueden utilizarse otros marcadores de citotoxicidad, tales como la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) o el azul tripano, si se puede demostrar que las tinciones alternativas ofrecen resultados similares a los del PI, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 2.2.

Análisis por citometría de flujo

19. Se analiza el nivel de expresión de CD86 y la viabilidad celular utilizando la citometría de flujo. Las células se representan dentro de una gráfica de puntos de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) a escala logarítmica, a fin de identificar claramente a la población en una primera ventana R1 y eliminar los desechos. El objetivo es medir un total de 10 000 células en la ventana R1 para cada pocillo. Las células de la misma ventana R1 se representan dentro de una gráfica de puntos FL3 o FL4 / SSC. Las células viables se definen mediante la separación de una segunda ventana R2 que seleccione la población de células negativas para el yoduro de propidio (canal FL3 o FL4). La viabilidad celular puede calcularse con la siguiente ecuación por el programa de análisis del citómetro. Cuando la viabilidad celular es baja, podrán medirse hasta 20 000 células, incluidas las células muertas. Como alternativa, también es posible medir los datos durante un minuto tras el inicio del análisis.

$$Viabilidad\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ medidas} \times 100$$

A continuación se mide el porcentaje de células FL1-positivas entre estas células viables seleccionadas en R2 (dentro de R1). La expresión en la superficie celular del CD86 se analiza en una gráfica de puntos de FL1/SSC seleccionada en células viables (R2).

En el caso de los pocillos de medio completo / IgG1, el marcador de análisis se sitúa cerca de la población principal, de manera que los controles del medio completo tengan IgG1 dentro de la zona diana del 0,6 al 0,9 %.

La interferencia del color se define como un desplazamiento de la gráfica de puntos de IgG1 marcada con FITC (media geométrica del IE de IgG1 FL1 \geq 150 %).

Los índices de estimulación (IE) del CD86 en las células del control (sin tratar o en un

0,4 % de DMSO) y en las células tratadas con producto se calculan de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$IE = \frac{\% \text{ de células tratadas } CD86^+ - \% \text{ de células tratadas}}{\% \text{ de células del control } CD86^+ - \% \text{ de células del control } IgG1^+} \times 100$$

% de células del control sin tratar $IgG1^+$: indicado como porcentaje de las células $IgG1$ FL1-positivas definidas con el marcador de análisis (intervalo aceptado de $\geq 0,6$ % y $< 1,5$ %, véase el punto 22) entre las células viables sin tratar.

% de células control/tratadas $IgG1^+/CD86^+$: indicado como porcentaje de células $IgG1/CD86$ FL1-positivas medidas sin desplazar el marcador de análisis entre las células control/tratadas viables.

DATOS E INFORME

Evaluación de los datos

20. En el ensayo U-SENS™ se calculan los parámetros siguientes: valor de CV70, es decir, concentración que muestra el 70 % de la supervivencia celular de U937 (30 % de citotoxicidad) y valor de EC150, es decir, la concentración a la que los productos problema han inducido un índice de estimulación (IE) de CD86 del 150 %.

CV70 se calcula por interpolación semilogarítmica mediante la ecuación siguiente:

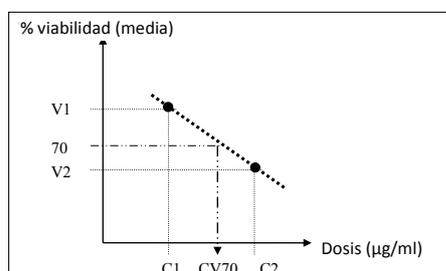
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

donde:

V1 es el valor mínimo de viabilidad celular superior al 70 %;

V2 es el valor máximo de viabilidad celular inferior al 70 %;

C1 y C2 son las concentraciones que muestran los valores de viabilidad celular V1 y V2, respectivamente.



Pueden utilizarse otros enfoques para obtener el valor de CV70 siempre que se demuestre que esto no afecta a los resultados (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para

demostrar la competencia).

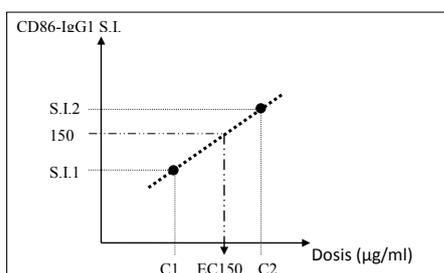
EC150 se calcula por interpolación semilogarítmica mediante la ecuación siguiente:

$$EC150 = C1 + [(150 - IE1) / (IE2 - IE1) * (C2 - C1)]$$

donde:

C1 es la concentración más alta en µg/ml con un IE de CD86 < 150 % (IE 1)

C2 es la concentración más baja en µg/ml con un IE de CD86 ≥ 150 % (IE 2).



Se calculan los valores de CE150 y CV70 según lo siguiente:

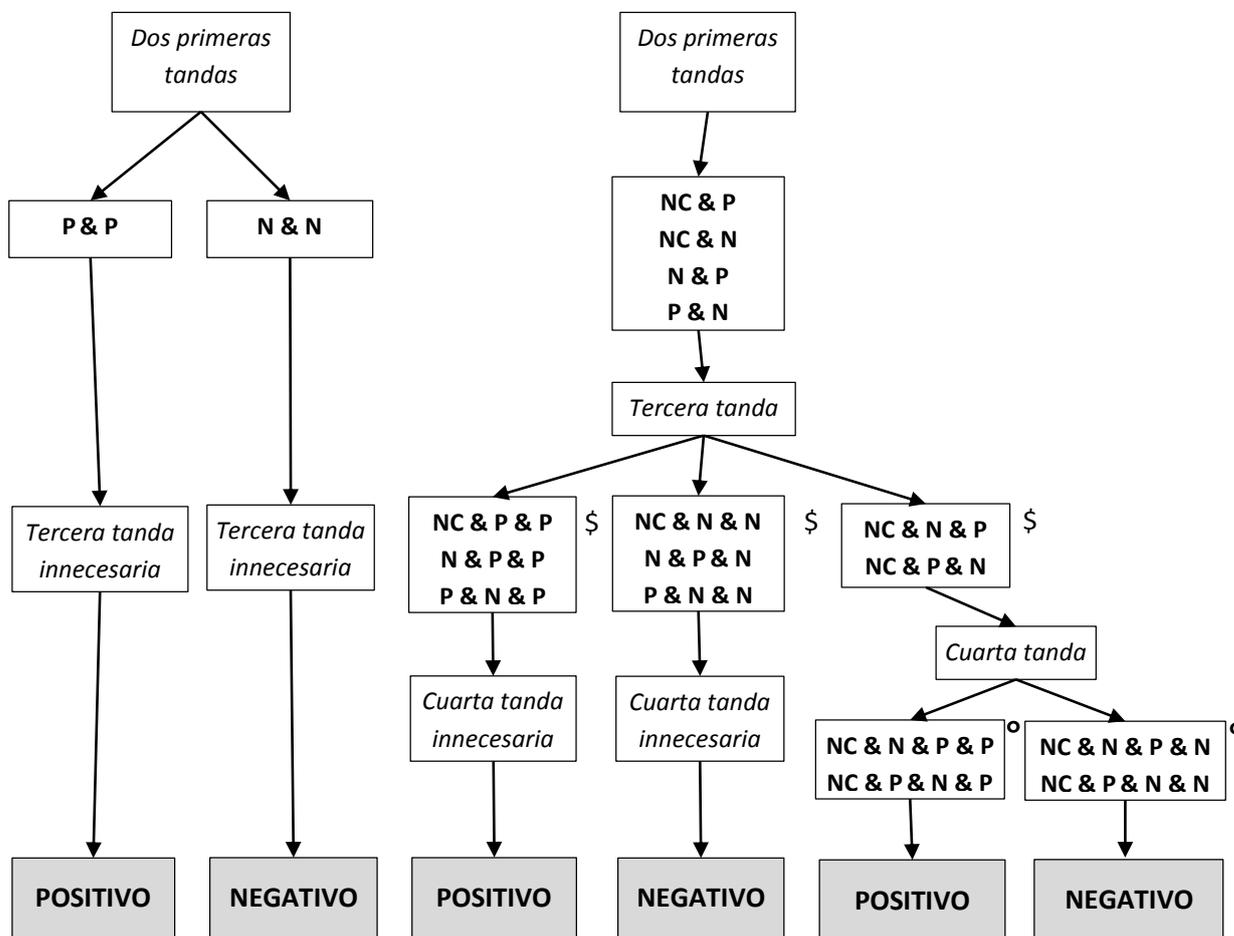
- con cada tanda: los valores individuales de CE150 y CV70 se utilizan como herramientas para investigar el efecto de respuesta a la concentración como aumento del CD86 (véase el punto 14),
- sobre la base de las viabilidades medias, se determina el valor global de CV70 (12),
- sobre la base de los valores medios del IE de CD86, se determina la CE150 global del producto problema clasificado como POSITIVO con el U-SENS™ (véase el punto 21) (12).

Modelo de asignación

21. Para la medición de la expresión de CD86, cada producto problema se somete en al menos dos concentraciones al menos a dos tandas independientes (realizadas en días diferentes) a fin de obtener una única asignación (POSITIVA o NEGATIVA).
 - La conclusión individual de una tanda de U-SENS™ se considera negativa (en lo sucesivo, "N") si el IE de CD86 es inferior al 150 % en todas las concentraciones no citotóxicas (viabilidad celular ≥ 70 %) y si no se observa interferencia [citotoxicidad, solubilidad (véase el punto 18) o color (véase el punto 19), con independencia de las concentraciones no citotóxicas a las que se detecte la interferencia]. En todos los demás casos (con el IE de CD86 superior o igual al 150 % y/o con interferencias observadas), la conclusión individual de una tanda U-SENS™ se considera positiva (en lo sucesivo, "P").

- Una asignación U-SENS™ se considera NEGATIVA si al menos dos tandas independientes son negativas (N) (figura 1). Si las dos primeras tandas son negativas (N), la asignación de U-SENS™ se considera NEGATIVA y no es necesario realizar la tercera tanda.
- Una asignación U-SENS™ se considera POSITIVA si al menos dos tandas independientes son positivas (P) (figura 1). Si las dos primeras tandas son positivas (P), la asignación de U-SENS™ se considera POSITIVA y no es necesario realizar la tercera tanda.
- Dado que no se ha realizado un ensayo de determinación de la dosis, hay una excepción si, en la primera tanda, el IE de CD86 es superior o igual al 150 % únicamente a la concentración no citotóxica más alta. La tanda se considera entonces NO CONCLUYENTE (NC), y deben someterse a ensayo, en tandas adicionales, otras concentraciones (entre la concentración no citotóxica más alta y la concentración citotóxica más baja, véase el punto 20). En caso de que una tanda se identifique como NC, deberán realizarse al menos dos tandas adicionales, y una cuarta tanda en caso de que las tandas 2 y 3 no sean concordantes (N y/o P independientemente) (figura 1). Las tandas de seguimiento se considerarán positivas aunque solo una concentración no citotóxica dé un CD86 igual o superior al 150 %, ya que la concentración se ha ajustado para el producto problema específico. La asignación final se basará en el resultado mayoritario de las tres o cuatro tandas individuales (es decir, 2 de 3 o 2 de 4) (figura 1).

Figura 1: Modelo de asignación utilizado en el ensayo U-SENS™. Las asignaciones obtenidas con el U-SENS™ deben interpretarse en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones del punto 4 y de los puntos 7,8 y 9 de la introducción general.



N: Tanda sin observación de resultado positivo del CD86 o de interferencia;

P: Tanda con observación de resultado positivo del CD86 y/o de interferencia o interferencias;

NC: No concluyente. Primera tanda no concluyente, cuando CD86 es positivo solo a la concentración no citotóxica más alta;

#: Un resultado individual no concluyente (NC) atribuido únicamente a la primera tanda implica automáticamente la necesidad de efectuar una tercera tanda para alcanzar una mayoría de resultados positivos (P) o negativos (N) en al menos 2 de 3 tandas independientes.

\$: Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las tres tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las dos primeras, indicadas en el recuadro superior.

°: Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las cuatro tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las tres primeras, indicadas en el recuadro superior.

Criterios de aceptación

22. Cuando se use el ensayo U-SENS™ deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación (12).

- Al final del período de exposición de 45 ± 3 horas, la viabilidad media de las células U937 sin tratar en triplicado ha de ser superior al 90 % y no debe observarse ninguna deriva en la expresión de CD86. La expresión basal de CD86 de las células U937 sin tratar debe estar comprendida entre $\geq 2\%$ y $\leq 25\%$.
- Cuando se utiliza el DMSO como disolvente, la validez del control del vehículo DMSO se evalúa calculando un valor del IE con DMSO comparado con el de las células no tratadas, y la viabilidad media de las células en triplicado debe ser superior al 90 %. El control del vehículo DMSO es válido si la media de los tres valores del IE de CD86 con él es inferior al 250 % de la media de los tres valores del IE de CD86 de las células U937 sin tratar.
- Las tandas se consideran válidas si al menos dos de los tres valores de IgG1 de células de U937 sin tratar caen dentro del intervalo de $\geq 0,6\%$ y $< 1,5\%$.
- El testigo negativo (ácido láctico) en paralelo se considera válido si al menos dos de las tres réplicas son negativas (IE de CD86 $< 150\%$) y no citotóxicas (viabilidad celular $\geq 70\%$).
- El testigo positivo (TNBS) se considera válido si al menos dos de las tres réplicas son positivas (IE de CD86 $\geq 150\%$) y no citotóxicas (viabilidad celular $\geq 70\%$).

Informe del ensayo

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

Sustancia 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;
- Aspecto físico, solubilidad en el medio completo, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;
- 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);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

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;
- Aspecto físico, solubilidad en el medio completo, solubilidad en DMSO y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;
- Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Testigos y controles

Testigo positivo

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Aspecto físico, solubilidad en DMSO, peso molecular y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;
- 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);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

Testigo negativo y control del disolvente o vehículo

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números 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.;

- Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos controles de disolvente o vehículo distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Condiciones de ensayo

- Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;
- Descripción del ensayo utilizado;
- Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, instalación en la que se ha obtenido);
- Citometría de flujo utilizada (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, los anticuerpos y el marcador de citotoxicidad utilizados;
- Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en la realización del ensayo mediante el ensayo de sustancias destinadas a tal fin, y el procedimiento utilizado para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo, por ejemplo datos de testigos históricos o datos históricos de controles de la reactividad.

Criterios de aceptación del ensayo

- Valores de la viabilidad celular y del IE de CD86 obtenidos con el control del disolvente o vehículo en comparación con los intervalos de aceptación;
- Valores de la viabilidad celular y del IE obtenidos con el testigo positivo en comparación con los intervalos de aceptación;
- Viabilidad celular de todas las concentraciones sometidas a ensayo del producto problema.

Procedimiento de ensayo

- Número de tandas utilizadas;
- Concentraciones del producto problema, tiempo de aplicación y de exposición utilizado (si es diferente del recomendado);
- Duración de la exposición;
- Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

Resultados

- Tabulación de los datos, incluidos la CV70 (si procede), el IE, los valores de viabilidad celular, los valores de CE150 (si procede) obtenidos con el producto problema y con el testigo positivo en cada tanda, y una indicación de la calificación del producto problema según el modelo de asignación;
- Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

Discusión de los resultados

- Discusión de los resultados obtenidos con el ensayo U-SENS™;
- Consideración de los resultados del ensayo obtenidos en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Puede consultarse en: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Disponible en: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Disponible en: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33 pp. Puede consultarse en: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: Publicaciones de las Naciones Unidas. Disponible en: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OCDE (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en:

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponible en: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Apéndice 2.1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados del 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 (14).

Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*): Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (15).

Respuesta del CD86 a la concentración: Se produce dependencia de la concentración (o respuesta a la concentración) cuando una concentración positiva (con IE de CD86 ≥ 150) va seguida de una concentración con un aumento del IE de CD86.

Producto: Sustancia o mezcla.

CV70: Concentración estimada que muestra una viabilidad celular del 70 %.

Deriva: La deriva se define por lo siguiente: i) el valor corregido del % CD86⁺ de la réplica 3 del testigo no tratado es inferior al 50 % de la media del valor corregido del % CD86⁺ de las réplicas 1 y 2 de los testigos no tratados; y ii) el valor corregido del % CD86⁺ de la réplica 3 del testigo negativo es inferior al 50 % de la media del valor corregido del % CD86⁺ de las réplicas 1 y 2 de los testigos negativos.

CE150: Concentraciones estimadas que muestran un IE de expresión del CD86 del 150 %.

Citometría de flujo: Técnica de citometría en la que las células suspendidas en un fluido fluyen una a una a través de un foco de luz excitadora, que se dispersa en patrones característicos según las células y sus componentes; las células están marcadas frecuentemente con marcadores fluorescentes, de modo que la luz se absorbe primero y, a continuación, se emite con una frecuencia modificada.

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.

IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*): Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

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

Sustancias 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.

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.

Pre-haptenos: Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica, p. ej. mediante oxidación.

Pro-haptenos: Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

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 ensayo (14).

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 y la repetibilidad intralaboratorios (14).

Tanda: Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos 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 (14).

IE: Índice de estimulación. Valores relativos de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia de las células tratadas con el producto en comparación con las células tratadas con disolvente.

Control del disolvente o vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes

de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control 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 ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (14).

Solución amortiguadora de tinción: Solución salina amortiguadora de fosfato con un 5 % de suero de ternera fetal.

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 ensayo.

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 (16).

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

Ensayo válido: 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 ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (14).

Apéndice 2.2

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención con el U-SENS™ de la clasificación prevista de las diez sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores de CV70 y CE150 que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia. Estas sustancias para demostrar la competencia se han seleccionado a fin de representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el ensayo U-SENS™. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el ensayo U-SENS™ (1) (8).

Cuadro 1: Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el ensayo U-SENS™

Sustancias para la competencia	N.º CAS	Estado físico	Asignación <i>in vivo</i> ¹	Disolvente /Vehículo de U-SENS™	Intervalo de referencia de CV70 en µg/ml ² de U-SENS™	Intervalo de referencia de CE150 en µg/ml ² de U-SENS™
4-Fenilendiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (fuerte)	Medio completo ³	< 30	Positivo (≤ 10)
Ácido picrilsulfónico	2508-19-2	Líquido	Sensibilizante (fuerte)	Medio completo	> 50	Positivo (≤ 50)
Maleato de dietilo	141-05-9	Líquido	Sensibilizante (moderado)	DMSO	10-100	Positivo (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Medio completo	> 100	Positivo (≤ 50)
Alcohol cinámico	104-54-1	Sólido	Sensibilizante (débil)	DMSO	> 100	Positivo (10-100)
4-Alilanisol	140-67-0	Líquido	Sensibilizante (débil)	DMSO	> 100	Positivo (< 200)
Sacarina	81-07-2	Sólido	No sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)
Glicerol	56-81-5	Líquido	No sensibilizante	Medio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	No sensibilizante	Medio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	No sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)

Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

¹ La asignación de peligro (y de potencia) *in vivo* se basa en datos del LLNA (8). La potencia *in vivo* se obtiene con los

criterios propuestos por ECETOC (17).

² Sobre la base de los valores históricos observados (1) (8).

³ Medio completo: Medio RMPI-1640 complementado con un 10 % de suero de ternera fetal, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (8).

Apéndice 3

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: ENSAYO IL-8 LUC

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. A diferencia de los ensayos que analizan la expresión de los marcadores de superficie celular, el ensayo IL-8 Luc cuantifica los cambios en la expresión de la IL-8, que es una citocina asociada a la activación de células dendríticas (DC). En la línea celular con el marcador IL-8 derivada de la THP-1 (THP-G8, establecida a partir de la línea celular de la leucemia monocítica aguda humana, THP-1), se mide la expresión de la IL-8 tras la exposición a los sensibilizantes (1). La expresión de la luciferasa se utiliza entonces para ayudar a discriminar entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.
2. Se ha evaluado el ensayo IL-8 Luc en un estudio de validación (2) realizado por el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (JaCVAM, Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods), el Ministerio de Economía, Comercio e Industria (METI, Ministry of Economy, Trade and Industry) y la Sociedad Japonesa de Alternativas a Experimentos con Animales (JSAAE, Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments) y posteriormente se ha sometido a una revisión independiente por pares (3) bajo los auspicios del JaCVAM y el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW), con el apoyo de la Cooperación Internacional sobre Métodos Alternativos de Ensayo (ICATM, International Cooperation on Alternative Test Methods). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, se considera que el ensayo IL-8 Luc es útil como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado. En la bibliografía se recogen ejemplos del uso de datos del ensayo IL-8 Luc en combinación con otra información (4) (5) (6).
3. El ensayo con IL-8 IL- ha demostrado ser transferible a los laboratorios con experiencia en el cultivo celular y la medición de la luciferasa. Las reproducibilidades dentro de un laboratorio y entre laboratorios eran del 87,7 % y del 87,5 %, respectivamente (2). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (2) y otras obras publicadas (1) (6) indican que, frente al LLNA, el ensayo IL-8 Luc consideró que 118 de 143 productos eran positivos o negativos y que 25 productos no eran concluyentes, y que la exactitud del ensayo IL-8 Luc en cuanto a la distinción entre sensibilizantes cutáneos (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y no sensibilizantes (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) es del 86 % (101/118) con una sensibilidad del 96 % (92/96) y una especificidad del 41 % (9/22). Excluidas las sustancias que no están en el ámbito de aplicabilidad que se describe más abajo (punto 5), el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o

negativos 113 de 136 productos y consideró no concluyentes 23 productos, y la exactitud del ensayo IL-8 Luc es del 89 % (101/113), con una sensibilidad del 96 % (92/96) y una especificidad del 53 % (9/17). Utilizando los datos humanos citados en Urbisch *et al.* (7), el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o negativos 76 de 90 productos, y consideró no concluyentes 14 productos, y la exactitud es del 80 % (61/76), la sensibilidad es del 93 % (54/58) y la especificidad es del 39 % (7/18). Excluidas las sustancias que no están en el ámbito de aplicabilidad, el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o negativos 71 de 84 productos y consideró no concluyentes 13 productos, y la exactitud es del 86 % (61/71), con una sensibilidad del 93 % (54/58) y una especificidad del 54 % (7/13). Es más probable que se den asignaciones negativas falsas con el ensayo IL-8 Luc en relación con los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que con los productos que presentan una potencia elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (6). En conjunto, la información avala la función del ensayo IL-8 Luc para identificar los peligros de sensibilización cutánea. Los valores de la exactitud aquí indicados para el ensayo IL-8 Luc utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los ensayos de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el ensayo IL-8 Luc es aplicable a productos problema que abarcan diversos grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (2) (6).
5. Aunque el ensayo IL-8 Luc utiliza X-VIVO™ 15 como disolvente, con él se han evaluado correctamente productos con un $\log K_{ow} > 3,5$ y los que tienen una hidrosolubilidad de alrededor de 100 µg/ml, según lo calculado por el EPI Suite™, y su comportamiento para detectar sensibilizantes con baja hidrosolubilidad es superior al del ensayo IL-8 Luc con dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente (2). Sin embargo, los resultados negativos de los productos problema que no se disuelven a 20 mg/ml pueden ser resultados negativos falsos debido a su incapacidad de disolverse en X-VIVO™ 15. Por tanto, no deben tenerse en cuenta los resultados negativos de estos productos. En el estudio de validación se observó una elevada tasa de falsos resultados negativos. Por otra parte, debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular (8) y a las condiciones experimentales, pueden dar resultados negativos en el ensayo los pro-haptenos (sustancias que requieren activación metabólica) y los pre-haptenos (sustancias activadas por oxidación con el aire). Sin embargo, aunque deben interpretarse con cautela los resultados negativos de posibles

pre/pro-haptenos, el ensayo IL-8 Luc ha considerado correctamente 11 de 11 pre-haptenos, 6/6 pro-haptenos y 6/8 pre/pro-haptenos en el conjunto de datos del ensayo con IL-8 Luc (2). Sobre la base de la reciente revisión global de tres ensayos sin animales (el DPRA, el KeratinoSens™ y el h-CLAT) para detectar pre y pro-haptenos (9), y sobre la base del hecho de que las células THP-G8 utilizadas en el ensayo IL-8 Luc son una línea celular derivada de la THP-1 que se utiliza en el ensayo h-CLAT, el ensayo IL-8 Luc puede también contribuir a aumentar la sensibilidad de los ensayos sin animales a fin de detectar pre y pro-haptenos en la combinación de otros ensayos. Los tensioactivos sometidos a ensayo hasta ahora han dado resultados positivos (falsos) independientemente de su tipo (por ejemplo, catiónicos, aniónicos o no iónicos). Por último, los productos que interfieren con la luciferasa pueden confundir su actividad/medición, provocando una mayor luminiscencia o una inhibición aparente (10). Por ejemplo, se ha informado de que unas concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 µM interfieren con las señales de luminiscencia en otros ensayos de luciferasa con gen marcador debido a la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa. En consecuencia, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos sospechosos de provocar la activación fitoestrogenoide del gen marcador de la luciferasa (11). Sobre la base de lo anterior, los tensioactivos, los anhídridos y los productos que interfieren con la luciferasa quedan fuera del ámbito de aplicación de este ensayo. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del ensayo IL-8 Luc a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este ensayo con tales categorías específicas.

6. Tal como se ha descrito anteriormente, el ensayo IL-8 Luc sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. Es necesario seguir trabajando, preferiblemente sobre la base de datos humanos, para determinar si los resultados del ensayo IL-8 Luc pueden contribuir a la evaluación de la potencia cuando se considere en combinación con otras fuentes de información.
7. En el apéndice 3.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El ensayo IL-8 Luc hace uso de la línea celular THP-1 de la leucemia monocítica humana, que se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Utilizando esta línea celular, el Departamento de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Tohoku, estableció una línea celular con el marcador IL-8 derivada de la THP-1, la THP-G8, que alberga los genes del naranja estable de luciferasa (SLO, *Stable Luciferase Orange*) y del rojo estable de luciferasa (SLR, *Stable Luciferase Red*), bajo el control del promotor de la IL-8 y del de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

(GAPDH), respectivamente (1). Esto permite la medición cuantitativa de la inducción del gen de la luciferasa mediante la detección de la luminiscencia a partir de sustratos de luciferasa bien establecidos que emiten luz como indicador de la actividad de la IL-8 y del GAPDH en células tras la exposición a productos sensibilizantes.

9. El sistema de ensayo de doble color incluye una luciferasa que emite luz naranja (SLO; $\lambda_{\text{máx}} = 580 \text{ nm}$) (12) correspondiente a la expresión génica del promotor de la IL-8, así como una luciferasa que emite luz roja (SLR; $\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$) (13) correspondiente a la expresión génica del promotor del testigo interno, GAPDH. Las dos luciferasas emiten distintos colores al reaccionar con la D-luciferina de la luciérnaga, y su luminiscencia se mide simultáneamente en una reacción de una sola fase, dividiendo la emisión de la mezcla de ensayo mediante un filtro óptico (14) (apéndice 3.2).
10. Las células THP-G8 se tratan durante 16 horas con el producto problema, tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa SLO (SLO-LA), que refleja la actividad del promotor de la IL-8, y la actividad de la luciferasa SLR (SLR-LA), que refleja la actividad del promotor de la GAPDH. Para que las abreviaturas sean fáciles de comprender, SLO-LA y SLR-LA se designan como IL8LA y GAPLA, respectivamente. El cuadro 1 presenta una descripción de los términos asociados a la actividad de la luciferasa en el ensayo IL-8 Luc. Los valores medidos se utilizan para calcular el valor normalizado de IL8LA (nIL8LA), que es la relación entre IL8LA y GAPLA; el factor de inducción de nIL8LA (Ind-IL8LA), que es la relación entre las medias aritméticas de los valores cuádruples medidos de la nIL8LA en las células THP-G8 tratadas con un producto problema y los valores de la nIL8LA de células THP-G8 sin tratar; y la inhibición de la GAPLA (Inh-GAPLA), que es la relación entre las medias aritméticas de los valores cuádruples medidos de la GAPLA en las células THP-G8 tratadas con un producto problema y los valores de la GAPLA de células THP-G8 sin tratar, y que se utiliza como indicador de la citotoxicidad.

Cuadro 1: Descripción de los términos asociados a la actividad de la luciferasa en el ensayo IL-8 Luc

Abreviaturas	Definición
GAPLA	Actividad de la luciferasa SLR que refleja la actividad del promotor de la GAPDH
IL8LA	Actividad de la luciferasa SLO que refleja la actividad del promotor de la IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA de células THP-G8 tratadas con productos / nIL8LA de células sin tratar
Inh-GAPLA	GAPLA de células THP-G8 tratadas con productos / GAPLA de células sin tratar
CV05	Concentración más baja del producto a la que el valor de Inh-GAPLA se hace $< 0,05$.

11. Se dispone de normas de comportamiento (NC) (15) para facilitar la validación de ensayos de la luciferasa IL-8 *in vitro* modificados similares al ensayo IL-8 Luc y que tienen en cuenta la modificación oportuna de las directrices de ensayo 442E de la OCDE para su inclusión. Solo se garantizará la aceptación mutua de datos de la OCDE (MAD, *Mutual Acceptance of Data*) respecto a los ensayos validados con arreglo a las NC, si estos ensayos han sido revisados e incluidos en las directrices de ensayo 442E por la OCDE (16).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

12. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el apéndice 3.3, de conformidad con las buenas prácticas de los métodos *in vitro* (17). Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 15) y con los testigos positivos y los controles del disolvente o vehículo (véanse los puntos 21-24), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

PROCEDIMIENTO

13. Está disponible el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para el ensayo IL-8 Luc y debe utilizarse al realizar el ensayo (18). Los laboratorios dispuestos a realizar el ensayo pueden obtener la línea celular THP-G8 recombinante de la empresa CPG Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, previa firma de un acuerdo de transferencia de material (MTA) según las condiciones del modelo de la OCDE. En los puntos siguientes se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del ensayo.

Preparación de las células

14. La línea celular THP-G8 de GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, es la que debe utilizarse para realizar el ensayo IL-8 Luc (véanse los puntos 8 y 13). Una vez recibidas, las células se propagan (2-4 pases) y se conservan congeladas como una población homogénea. Las células de esta población pueden propagarse hasta un máximo de 12 pases o un máximo de 6 semanas. El medio utilizado para la propagación es el medio de cultivo RPMI-1640 que contiene un 10 % de suero bovino fetal (FBS), solución antibiótica/antimicótica (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B en una

solución salina del 0,85 %) (p. ej., GIBCO Cat # 15240-062), 0,15 µg/ml de puromicina (p. ej., n.º CAS 58-58-2) y 300 µg/ml de G418 (p. ej., n.º CAS 108321-42-2).

15. Antes de utilizarse para el ensayo, las células deben ser objeto de un control de reactividad. Este control debe realizarse 1-2 semanas o 2-4 pases después de la descongelación, utilizando el testigo positivo, el bromuro de 4-nitrobencilo (4-NBB) (n.º CAS 100-11-8, ≥ 99 % de pureza) y el testigo negativo, el ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, ≥ 85 % de pureza). El 4-NBB debe producir una respuesta positiva de Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), mientras que el LA debe dar una respuesta negativa de Ind-IL8LA ($< 1,4$). Solo se pueden utilizar para el ensayo las células que hayan superado el control de reactividad. Este control debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 22 a 24.
16. Para el ensayo, se siembran células THP-G8 a una densidad de $2-5 \times 10^5$ células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 48-96 horas. El día del ensayo, se lavan las células recolectadas del matraz de cultivo utilizando RPMI-1640 con un 10 % de FBS sin antibióticos y, a continuación, se vuelven a suspender con RPMI-1640 con un 10 % de FBS sin antibióticos a la densidad de 1×10^6 células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (p. ej., Costar Cat#3603) a razón de 50 µl (5×10^4 células) por pocillo.

Preparación del producto problema y de las sustancias testigo

17. El producto problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Para el ensayo IL-8 Luc, los productos problema se disuelven en X-VIVO™ 15, un medio exento de suero disponible en el mercado (Lonza, 04-418Q), hasta la concentración final de 20 mg/ml. Se añade X-VIVO™ 15 a 20 mg de producto problema (con independencia de la solubilidad del producto) en un tubo de microcentrifugadora, y se lleva al volumen de 1 ml; a continuación se mezcla enérgicamente en vórtex y se agita en un rotor a una velocidad máxima de 8 rpm durante 30 minutos a una temperatura ambiente de unos 20 °C. Además, si los productos sólidos siguen sin disolverse, el tubo se somete a ultrasonidos hasta que el producto se disuelve totalmente o se dispersa de forma estable. En el caso de productos problema solubles en X-VIVO™ 15, la solución se diluye por un factor de 5 con X-VIVO™ 15 y se utiliza como solución madre del producto problema en X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). En el caso de productos problema insolubles en X-VIVO™ 15, la mezcla se pone en rotación de nuevo durante al menos 30 minutos, y se centrifuga después a 15 000 rpm ($\approx 20\,000$ g) durante 5 min. El sobrenadante resultante se utiliza como solución madre del producto problema en X-VIVO™ 15. Debe aportarse una justificación científica del uso de otros disolventes, como el DMSO, el agua o el medio de cultivo. El procedimiento detallado para la disolución de productos figura en el apéndice 3.5. Las soluciones en X-VIVO™ 15 descritas en los puntos 18-23 se mezclan 1: 1 (v/v) con las

suspensiones celulares preparadas en la placa negra de fondo plano de 96 pocillos (véase el punto 16).

18. La primera tanda del ensayo tiene por objeto determinar la concentración citotóxica y examinar el potencial de sensibilización cutánea de los productos. Utilizando el X-VIVO™ 15, se hacen diluciones en serie de las soluciones madre de los productos problema en X-VIVO™ 15, con un factor de dilución de dos (véase el apéndice 3.5) utilizando un bloque de ensayo de 96 pocillos (p. ej., Costar Cat # EW-01729-03). A continuación, se añaden 50 µl/pocillo de la solución diluida a 50 µl de la suspensión celular en una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Por lo tanto, en el caso de los productos problema solubles en X-VIVO™ 15, las concentraciones finales de los productos problema van de 0,002 a 2 mg/ml (apéndice 3.5). En el caso de los productos problema que no son solubles en X-VIVO™ 15 a la concentración de 20 mg/ml, solo se determinan los factores de dilución que van de 2 a 2¹⁰, si bien las concentraciones finales reales de los productos problema siguen siendo inciertas y dependen de la concentración saturada de los productos problema en la solución madre en X-VIVO™ 15.
19. En tandas de ensayo posteriores (es decir, las réplicas segunda, tercera y cuarta), la solución madre de X-VIVO™ 15 se hará a una concentración 4 veces superior a la concentración de viabilidad celular 05 (CV05, concentración más baja a la que el valor de Inh-GAPLA se hace < 0,05) del primer experimento. Si el valor de Inh-GAPLA no se reduce por debajo de 0,05 con la concentración más elevada en la primera tanda, la solución madre en X-VIVO™ 15 se hace a la concentración más alta de la primera tanda. La concentración CV05 se calcula dividiendo la concentración de la solución madre en la primera tanda por el primer factor de dilución correspondiente a CV05 (X) [factor de dilución CV05 (X), que es el factor de dilución necesario para diluir la solución madre hasta CV05] (véase el apéndice 3.5). En el caso de sustancias problema insolubles en X-VIVO a 20 mg/ml, el valor de CV05 se determina mediante la concentración de la solución madre x 1/X. En las tandas 2 a 4, se prepara una segunda solución madre a 4 x CV05 (apéndice 3.5).
20. De las segundas soluciones madre en X-VIVO™ 15 se realizan diluciones en serie con un factor de dilución de 1,5 utilizando un bloque de ensayo de 96 pocillos. A continuación, se añaden 50 µl/pocillo de la solución diluida a 50 µl de la suspensión celular en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Cada concentración de cada producto problema debe ensayarse en 4 pocillos. A continuación, las muestras se mezclan con un agitador de placas y se incuban durante 16 horas a 37 °C y con 5 % de CO₂, tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe a continuación.
21. El control del disolvente es la mezcla de 50 µl/pocillo de X-VIVO™ 15 y de 50 µl/pocillo de suspensión celular en RPMI-1640 con un 10 % de FBS.

22. El testigo positivo recomendado es el 4-NBB. Se preparan 20 mg de 4-NBB en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, al que se añade X-VIVO™ 15 hasta completar 1 ml. Se mezcla enérgicamente en vórtex el contenido del tubo y se agita en un rotor a la velocidad máxima de 8 rpm durante al menos 30 minutos. Tras la centrifugación a 20 000 g durante 5 min, el sobrenadante se diluye por un factor de 4 con X-VIVO™ 15, y se transfieren 500 µl del sobrenadante diluido a un pocillo de un bloque de ensayo de 96 pocillos. El sobrenadante diluido se diluye más con X-VIVO™ 15 por factores de 2 y 4, y se añaden 50 µl de la solución a 50 µl de la suspensión de células THP-G8 en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (apéndice 3.6). Cada concentración del testigo positivo debe ensayarse en 4 pocillos. La placa se agita en un agitador de placas y se incuba en una incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % de CO₂), tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe en el punto 29.
23. El testigo negativo recomendado es el LA. Se preparan 20 mg de este en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, al que se añade X-VIVO™ 15 hasta completar 1 ml (20 mg/ml). Una solución de 20 mg/ml de solución de LA se diluye por un factor de 5 con X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); se transfieren 500 µl de esta solución de LA de 4 mg/ml a un pocillo de un bloque de ensayo de 96 pocillos. Esta solución se diluye por un factor de 2 con X-VIVO™ 15 y después se diluye de nuevo por un factor de 2 para producir soluciones de 2 mg/ml y 1 mg/ml. Se añaden 50 µl de estas 3 soluciones y el control del vehículo (X-VIVO™ 15) a 50 µl de suspensión de células THP-G8 en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Cada concentración del testigo negativo debe ensayarse en 4 pocillos. La placa se agita en un agitador de placas y se incuba en una incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % de CO₂), tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe en el punto 29.
24. Podrán utilizarse otros testigos positivos o negativos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas.
25. Deben tomarse precauciones para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre pocillos por productos problema, por ejemplo tapando la placa antes de la incubación con los productos problema.
26. Los productos problema y el control de disolvente requieren de 2 a 4 tandas para obtener una asignación positiva o negativa (véase el cuadro 2). Cada tanda se realiza un día diferente con nueva solución madre de los productos problema en X-VIVO™ 15 y células recolectadas de forma independiente. Las células pueden proceder del mismo pase.

Mediciones de la actividad de la luciferasa

27. La luminiscencia se mide mediante un luminómetro de microplacas de 96 pocillos, equipado con filtros ópticos, como, p. ej., Phios (ATTO, Tokio, Japón), Tristan 941

(Berthold, Bad Wildbad, Alemania) y la serie ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). El luminómetro deberá calibrarse para cada ensayo, a fin de garantizar la reproducibilidad (19). Para esta calibración se dispone de luciferasas recombinantes que emiten luz de color naranja y rojo.

28. A cada pocillo de la placa que contenga la suspensión celular tratada con o sin producto se transfieren 100 μ l del reactivo precalentado de ensayo de la luciferasa Tripluc[®] (Tripluc). Se agita la placa durante 10 minutos a una temperatura ambiente de 20 °C aproximadamente. La placa se coloca en el luminómetro para medir la actividad de la luciferasa. Se mide la bioluminiscencia durante 3 segundos tanto en ausencia (F0) como en presencia (F1) del filtro óptico. Debe justificarse el uso de otras condiciones, por ejemplo en función del modelo de luminómetro utilizado.
29. Los parámetros de cada concentración se calculan a partir de los valores medidos, por ejemplo IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la media \pm DT de IL8LA, la media \pm DT de GAPLA, la media \pm DT de nIL8LA, la media \pm DT de Ind-IL8LA, la media \pm DT de Inh-GAPLA, y el intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA. Las definiciones de los parámetros utilizados en este punto figuran en los apéndices I y IV, respectivamente.
30. Antes de proceder a la medición, la discriminación del color en los ensayos con marcadores multicolor se consigue generalmente utilizando detectores (luminómetro y lector de placas) equipados con filtros ópticos, tales como filtros de corte agudo (de paso largo o de paso corto) o filtros de paso de banda. Los coeficientes de transmisión de los filtros para cada color de la señal de luminiscencia deben calibrarse antes del ensayo, según el apéndice 3.2.

DATOS E INFORME

Evaluación de los datos

31. Los criterios para una decisión positiva o negativa exigen que, en cada una de las fases:
 - se considere positiva una asignación del ensayo IL-8 Luc si un producto problema tiene un Ind-IL8LA $\geq 1,4$ y el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % del Ind-IL8LA $\geq 1,0$;
 - se considere negativa una asignación del ensayo IL-8 Luc si un producto problema tiene un Ind-IL8LA $< 1,4$ y/o el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA $< 1,0$.

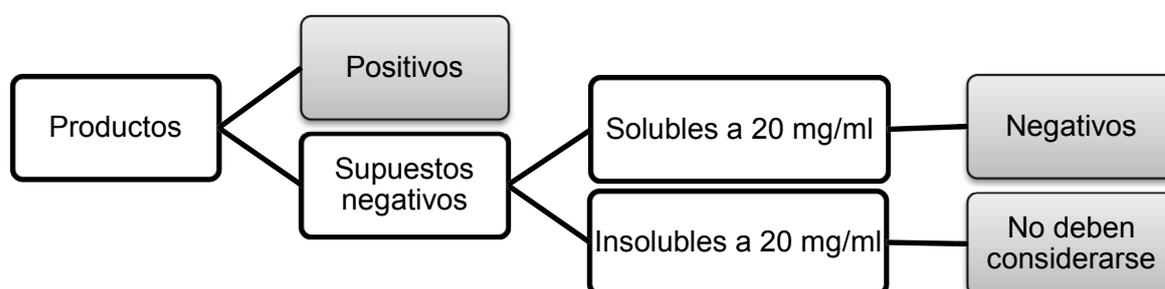
Modelo de asignación

32. Los productos problema que proporcionan dos resultados positivos de entre las tandas primera, segunda, tercera o cuarta se identifican como positivos, mientras que los que dan tres resultados negativos de entre las tandas primera, segunda, tercera o cuarta se identifican como supuestos negativos (cuadro 2). Entre los productos supuestos negativos, los productos que se disuelven a la concentración de 20 mg/ml de X-VOVO™ 15 se consideran negativos, mientras que los productos que no se disuelven a la concentración de 20 mg/ml de X-VOVO™ 15 no deben tenerse en cuenta (figura 1).

Cuadro 2: Criterios para identificar positivos y supuestos negativos

1. ^a tanda	2. ^a tanda	3. ^a tanda	4. ^a tanda	Clasificación final
Positivo	Positivo	-	-	Positivo
	Negativo	Positivo	-	Positivo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Supuesto negativo
Negativo	Positivo	Positivo	-	Positivo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Supuesto negativo
	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
			Negativo	Supuesto negativo
		Negativo	-	Supuesto negativo

Figura 1: Modelo de asignación para la decisión final



Criterios de aceptación

33. Deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación cuando se use el ensayo IL-8 Luc.

- El valor de Ind-IL8LA debe ser superior a 5,0 a al menos una concentración del testigo positivo, 4-NBB, en cada tanda.
- El valor de Ind-IL8LA debe ser inferior a 1,4 a cualquier concentración del testigo negativo, ácido láctico, en cada tanda.
- Deben rechazarse los datos de las placas en las que la GAPLA de los pocillos testigo con células y Tripluc pero sin productos sea inferior a 5 veces la de los pocillos con solo medio de ensayo (50 µl/pocillo de RPMI-1640 con un 10 % de FBS y 50 µl/pocillo de X-VIVO™ 15).
- Deben rechazarse los datos de las placas en las que la Inh-GAPLA de todas las concentraciones de los productos problema o testigo sea inferior a 0,05. En este caso, debe repetirse el primer ensayo de manera que la concentración final más alta del ensayo repetido sea la concentración final más baja del ensayo anterior.

Informe del ensayo

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

Productos 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;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;
- 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);
- Solubilidad en X-VIVO™ 15. En el caso de los productos que sean insolubles en X-VIVO™ 15, si se observa precipitación o flotación después de la centrifugación;
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema si no se ha utilizado X-VIVO™ 15.

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;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;
- Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;
- Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);
- Solubilidad en X-VIVO™ 15. En el caso de los productos que sean insolubles en X-VIVO™ 15, si se observa precipitación o flotación después de la centrifugación;
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.
- Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema si no se ha utilizado X-VIVO™ 15.

Testigos

Testigo positivo:

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;
- Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;
- 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);
- Concentración o concentraciones estudiadas;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación, si procede.

Testigo negativo:

- Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, y/u otros identificadores;

- Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;
- Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos testigos negativos distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;
- Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;
- Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema.

Condiciones de ensayo

- Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;
- Descripción del ensayo utilizado;
- Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, laboratorio donde se ha obtenido);
- Número de lote y origen del FBS, nombre del proveedor, número de lote de la placa negra de fondo plano de 96 pocillos y número de lote del reactivo Tripluc;
- Número de pases y densidad celular utilizados para el ensayo;
- Método de recuento de células utilizado para la siembra antes del ensayo, y medidas adoptadas para garantizar la homogeneidad de la distribución del número de células;
- Luminómetro utilizado (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, sustrato de luciferasa utilizado, y demostración de las mediciones adecuadas de luminiscencia sobre la base del ensayo de control descrito en el apéndice 3.2;
- Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en cuanto a la realización del ensayo (por ejemplo, mediante el ensayo de sustancias de la prueba de la competencia) o para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo.

Procedimiento de ensayo

- Número de réplicas y de tandas efectuadas;
- Concentraciones del producto problema, procedimiento de aplicación y tiempo de exposición (si son diferentes de los recomendados);
- Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;
- Descripción de los criterios de aceptación del estudio seguidos;
- Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

Resultados

- Mediciones de IL8LA y GAPLA;
- Cálculos de nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;
- Intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA;
- Gráfico que muestre las curvas dosis-respuesta en cuanto a la inducción de la actividad de la luciferasa y la viabilidad;
- Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

Discusión de los resultados

- Discusión de los resultados obtenidos con el ensayo IL-8 Luc;
- Consideración de los resultados del ensayo en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OCDE (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OCDE (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OCDE (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, Publicaciones de la OCDE, París. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OCDE (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCDE, París, Francia.
- (16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCDE, París, Francia.
- (17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organización para la

Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en:
[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Disponible en:
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCDE, París, Francia.
- (21) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Sexta edición revisada. Nueva York & 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

Apéndice 3.1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados del 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 (16).

Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*): Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (20).

Producto: Sustancia o mezcla.

CV05: Viabilidad celular 05, es decir, concentración mínima a la que los productos muestran un valor de Inh-GAPLA inferior a 0,05.

FInSLO-LA: Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la Ind-IL8LA. Véase la definición de Ind-IL8LA.

GAPLA: Actividad de luciferasa del rojo estable de luciferasa (SLR) ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$), regulada por el promotor de la GAPDH y que demuestra la viabilidad celular y el número de células viables.

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.

IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*): Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

II-SLR-LA: Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la Inh-GAPLA. Véase la definición de Inh-GAPLA.

IL-8 (interleucina-8): Citocina derivada de células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y monocitos que provoca quimiotaxia de neutrófilos y linfocitos T.

IL8LA: Actividad de la luciferasa del naranja estable de luciferasa (SLO) ($\lambda_{\text{máx}} = 580$

nm), regulada por el promotor de la IL-8.

Ind-IL8LA: Factor multiplicador de la inducción de nIL8LA. Se obtiene dividiendo el valor de la nIL8LA de las células THP-G8 tratadas con los productos por el de las células THP-G8 no estimuladas y representa la inducción de la actividad del promotor de la IL-8 por los productos.

Inh-GAPLA: Inhibición de la GAPLA. Se obtiene dividiendo el valor de la GAPLA de las células THP-G8 tratadas con productos por el de la GAPLA de THP-G8 no tratadas y representa la citotoxicidad de los productos.

Umbral mínimo de inducción (MIT): Concentración más baja a la que un producto cumple los criterios positivos.

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 más de uno de los componentes principales están 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.

nIL8LA: Actividad de la luciferasa SLO que refleja la actividad del promotor de la IL-8 (IL8LA), normalizada por la actividad de la luciferasa SLR, que refleja la actividad del promotor de la GAPDH (GALPA). Representa la actividad del promotor de la IL-8 tras considerar la viabilidad celular o el número de células.

nSLO-LA: Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la nIL8LA. Véase la definición de nIL8LA.

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.

Pre-haptenos: Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica.

Pro-haptenos: Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

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 ensayo (16).

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 y la repetibilidad intralaboratorios (16).

Tanda: Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

Sensibilidad: Proporción de todos los productos activos/positivos 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 (16).

SLO-LA: Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la IL8LA. Véase la definición de IL8LA.

SLR-LA: Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la GAPLA. Véase la definición de GAPLA.

Control del disolvente o vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control de 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 ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (16).

Sustancia: Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las eventuales impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin influir en la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición.

Tensioactivo: También denominado agente tensioactivo, es una sustancia, 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 (TG437).

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método.

THP-G8: Línea celular con el marcador IL-8 utilizada en el ensayo IL-8 Luc. La línea celular humana THP-1, similar a los macrófagos, fue transinfectada con los genes de la luciferasa SLO y SLR bajo el control de los promotores de la IL-8 y de la GAPDH, respectivamente.

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 (21).

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

Método de ensayo válido: 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 ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado.

Apéndice 3.2

PRINCIPIO DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA Y DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE TRANSMISIÓN DEL FILTRO ÓPTICO RESPECTO A SLO Y SLR

El sistema de ensayo multimarcaador (Tripluc) puede utilizarse con un luminómetro de microplacas con un sistema de detección multicolor que puede combinarse con un filtro óptico [por ejemplo, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. El filtro óptico utilizado en la medición es un filtro de paso largo o corto de 600-620 nm o un filtro de paso de banda de 600-700 nm.

Medición de luciferasas de dos colores con un filtro óptico.

En el ejemplo aquí presentado se utiliza Phelios AB-2350 (ATTO). Este luminómetro está equipado con un filtro de paso largo (LP, *long pass*) de 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filtro 1) para separar la luminiscencia SLO ($\lambda_{\text{máx}} = 580$ nm) de la SLR ($\lambda_{\text{máx}} = 630$ nm).

Para determinar los coeficientes de transmisión del LP de 600 nm, primero, utilizando enzimas luciferasa SLO y SLR purificadas, ha de medirse: i) la intensidad de la bioluminiscencia SLO y SLR sin filtro (F0), ii) la intensidad de la bioluminiscencia SLO y SLR que ha pasado por el LP de 600 nm (filtro 1), y iii) calcular los coeficientes de transmisión del LP de 600 nm respecto a SLO y SLR que se recogen más abajo.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Si las intensidades de SLO y SLR en la muestra problema se expresan como O y R, respectivamente, i) la intensidad de la luz sin filtro (totalmente óptica) F0 y ii) la intensidad de la luz que se transmite por el LP de 600 nm (filtro 1) F1 se describen como se indica a continuación:

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Estas fórmulas pueden expresarse también de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

A continuación, utilizando los factores de transmitancia calculados ($\kappa_{O_{R60}}$ y $\kappa_{R_{R60}}$) y los valores medidos de F0 y F1, podrán calcularse los valores de O y R como sigue:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{O_{R60}} & \kappa_{R_{R60}} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiales y métodos para determinar el factor de transmitancia

1) Reactivos

Enzimas luciferasa aisladas y purificadas:

Enzima SLO purificada y liofilizada

Enzima SLR purificada y liofilizada

(que para el trabajo de validación se obtuvieron de GPC Lab. GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, con la línea celular THP-G8).

Reactivo de ensayo:

Reactivo de ensayo de la luciferasa Tripluc[®] (por ejemplo, de TOYOBO Cat#MRA-301)

Medio: para el ensayo de la luciferasa (30 ml, conservado a 2-8 °C)

Reactivo	Conc.	Conc. final en medio	Cantidad necesaria
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Preparación de la solución de enzima:

Disolver la enzima luciferasa purificada y liofilizada en un tubo mediante la adición de 200 μ l de Tris/HCl o HEPES/HCl 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0), complementados con glicerol al 10 % (p/v); dividir la solución de enzima en alícuotas de 10 μ l puestas en tubos desechables de 1,5 ml y conservarlas en congelador a -80 °C; la solución de enzima congelada podrá utilizarse durante un máximo de 6 meses. Cuando se utiliza, se añade 1 ml de medio para el ensayo de la luciferasa (RPMI-1640 con un 10 % de FBS) a cada tubo que contiene las soluciones de enzima (solución diluida de enzima) y se mantiene en hielo para evitar la desactivación.

3) Medición de la bioluminiscencia

Descongelar el reactivo de ensayo de la luciferasa Tripluc[®] (Tripluc) y mantenerlo a temperatura ambiente en un baño de agua o al aire. Encender el luminómetro 30 min antes del inicio de la medición para permitir que se estabilice el fotomultiplicador.

Pasar 100 µl de la solución diluida de enzima a una placa negra de 96 pocillos (fondo plano) (la muestra de referencia de SLO a #B1, #B2, #B3, la muestra de referencia de SLR a #D1, #D2, #D3). A continuación, pasar 100 µl de Tripluc precalentado a cada pocillo de la placa que contiene la solución diluida de enzima, utilizando una micropipeta. Agitar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C) utilizando un agitador de placas. Eliminar las eventuales burbujas que aparezcan en las soluciones de los pocillos. Colocar la placa en el luminómetro para medir la actividad de la luciferasa. Se mide la bioluminiscencia durante 3 segundos tanto en ausencia (F0) como en presencia (F1) del filtro óptico.

Se calcula el coeficiente de transmisión del filtro óptico de la manera siguiente:

Coeficiente de transmisión [SLO (κ_{OR60})] = (#B1 de F1 + #B2 de F1 + #B3 de F1) / (#B1 de F0 + #B2 de F0 + #B3 de F0)

Coeficiente de transmisión [SLR (κ_{RR60})] = (#D1 de F1 + #D2 de F1 + #D3 de F1) / (#D1 de F0 + #D2 de F0 + #D3 de F0)

Los factores de transmitancia calculados se utilizan para todas las mediciones realizadas con el mismo luminómetro.

Control de calidad del equipo

Se utilizarán los procedimientos descritos en el protocolo IL-8 (18).

Apéndice 3.3

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la obtención con el ensayo IL-8 Luc de la clasificación prevista de las diez sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia (seleccionadas para representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea). Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el ensayo IL-8 Luc. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el ensayo IL-8 Luc (6) (1).

Cuadro 1: Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el ensayo IL-8 Luc

Sustancias para la competencia	N° CAS	Estado físico	Solubilidad en X-VIVO15 a 20 mg/ml	Asignación <i>in vivo</i> ¹	Asignación con IL-8 Luc ²	Intervalo de referencia (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	MIT con IL-8 Luc ⁵
2,4-Dinitroclorobenceno	97-00-7	Sólido	Insoluble	Sensibilizante (extremo)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehído	50-00-0	Líquido	Soluble	Sensibilizante (fuerte)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Insoluble	Sensibilizante (moderado)	Positivo	250-290	60-250
Etilendiamina	107-15-3	Líquido	Soluble	Sensibilizante (moderado)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Dimetacrilato de etilenglicol	97-90-5	Líquido	Insoluble	Sensibilizante (débil)	Positivo	> 2000	0,04-0,1
4-Alilanisol (estragol)	140-67-0	Líquido	Insoluble	Sensibilizante (débil)	Positivo	> 2000	0,01-0,07
Sulfato de estreptomina	3810-74-0	Sólido	Soluble	No sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Glicerol	56-81-5	Líquido	Soluble	No sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Soluble	No sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000

Abreviaturas: N° CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

¹ La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (19).

² Sobre la base de los valores históricos observados (1) (6).

³ Los valores de CV05 y MIT con IL-8 Luc, Luc MIT se han calculado sobre la base de la hidrosolubilidad que da el EPI Suite™.

⁴ CV05: Concentración mínima a la que los productos muestran un valor de Inh-GAPLA inferior a 0,05.

⁵ MIT: Concentración más baja a la que un producto cumple los criterios positivos.

Apéndice 3.4

ÍNDICES Y CRITERIOS DE DECISIÓN

nIL8LA (nSLO-LA)

Se mide la repetición j ($j = 1-4$) de la concentración i ($i = 0-1$) en el caso de la IL8LA (SLO-LA) y la GAPLA (SLR-LA) respectivamente. La IL8LA normalizada, denominada nIL8LA (nSLO-LA), se define como:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Esta es la unidad básica de medición de este ensayo.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

El número de veces que aumenta el promedio de nIL8LA (nSLO-LA) en la repetición a la concentración i con respecto a su valor a la concentración 0, Ind-IL8LA, es la medida primaria de este ensayo. Esta relación se expresa con la siguiente fórmula:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

El laboratorio principal ha propuesto que un valor de 1,4 corresponde a un resultado positivo para el producto problema. Este valor se basa en la investigación de los datos históricos del laboratorio principal. El equipo de gestión de datos utilizó después este valor a través de todas las fases del estudio de validación. El resultado primario, Ind-IL8LA, es el cociente de dos medias aritméticas, tal como se indica en la ecuación.

Intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %)

Puede estimarse que el intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %) basado en el cociente muestra la precisión de la medida de este resultado primario. Un límite inferior del IC del 95 % ≥ 1 indica que la nIL8LA a la concentración i es significativamente mayor que la del control del disolvente. Hay varias formas de construir el IC del 95 %. Hemos utilizado en este estudio el método conocido como teorema de Fieller. Este teorema sobre el intervalo de intervalo de confianza del 95 % se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

donde:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ y } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{iL8LA_{0j}}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ es el percentil 97,5 de la distribución t central con la v del grado de libertad, donde

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

La Inh-GAPLA es una relación entre el promedio de la GAPLA (SLR-LA) correspondiente a la repetición de la concentración i en comparación con la del control del disolvente, y su valor viene dado por:

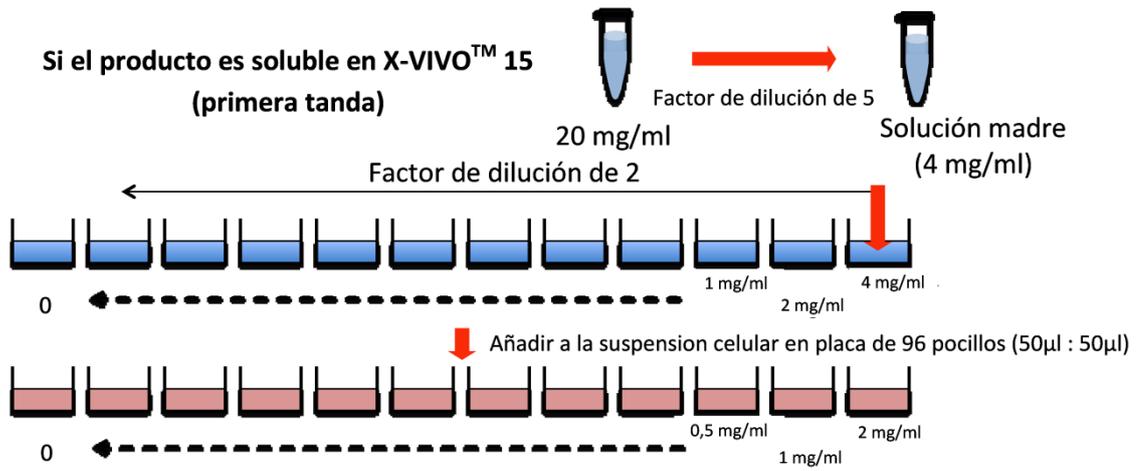
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Como la GAPLA es el denominador de la n_{iL8LA}, un valor sumamente pequeño causa una gran variación en el n_{iL8LA}. Por tanto, los valores de Ind-IL8LA con un valor extremadamente bajo de Inh-GAPLA (menos de 0,05) pueden considerarse de escasa precisión.

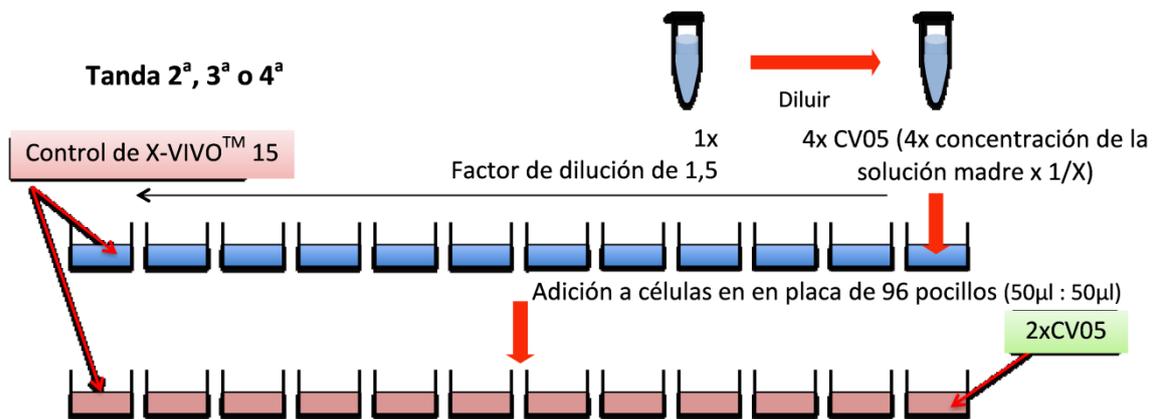
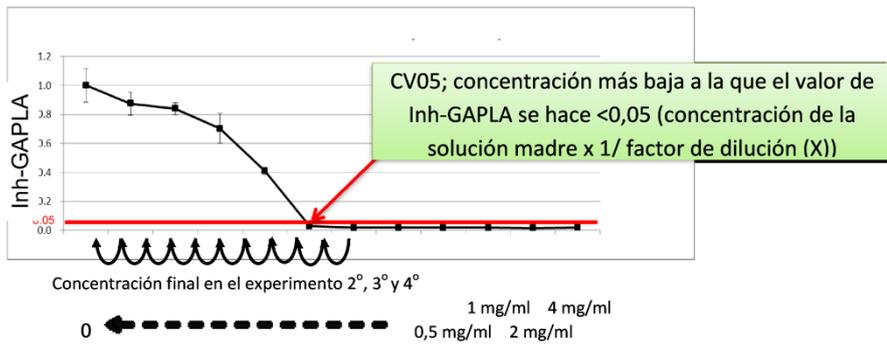
Apéndice 3.5

ESQUEMA DE LOS MÉTODOS DE DISOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS PARA EL ENSAYO IL-8 LUC

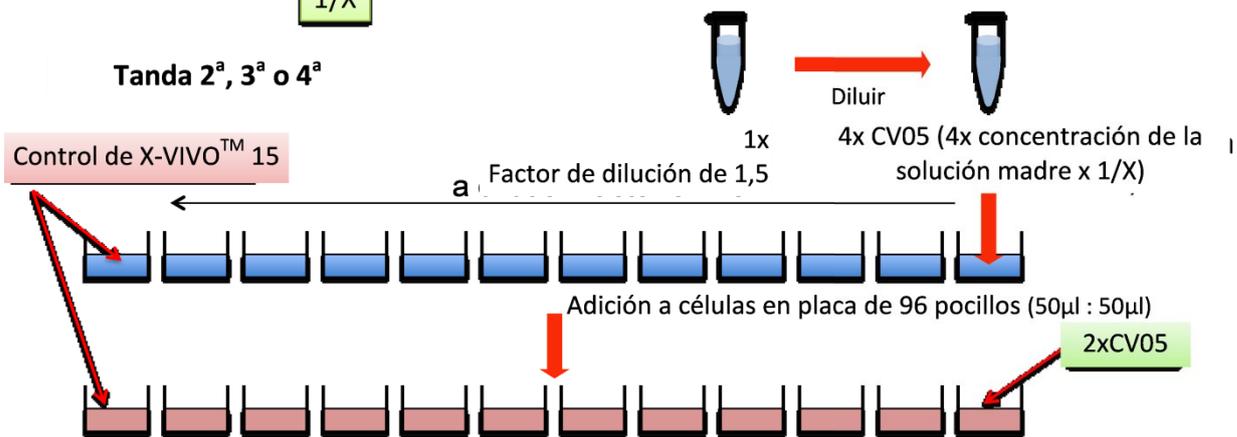
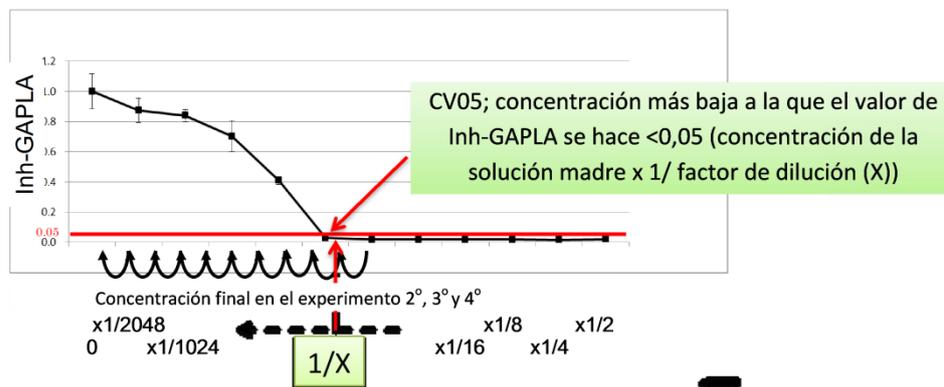
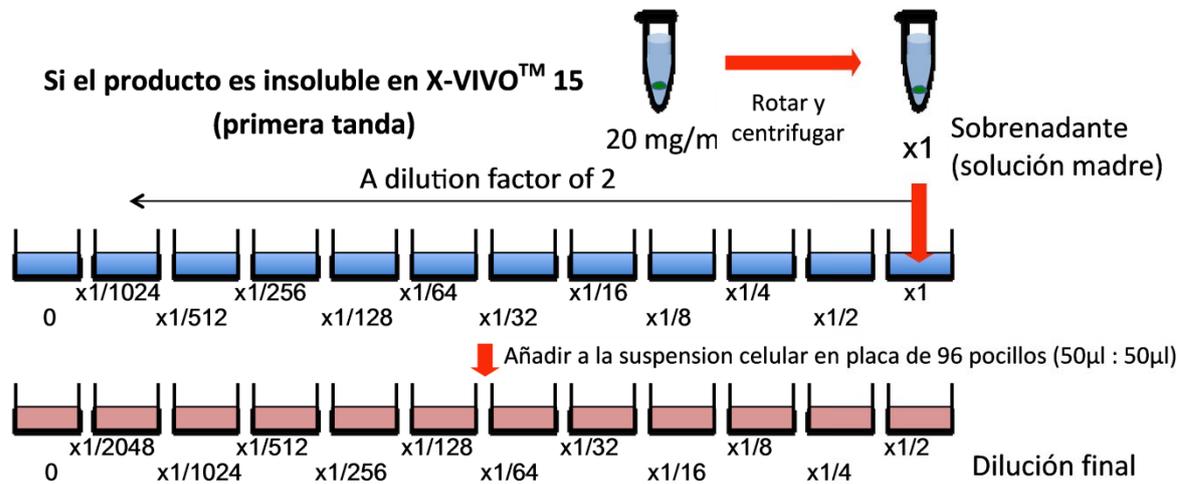
- a) En el caso de los productos disueltos en X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



Determinar la concentración más elevada de los siguientes experimentos

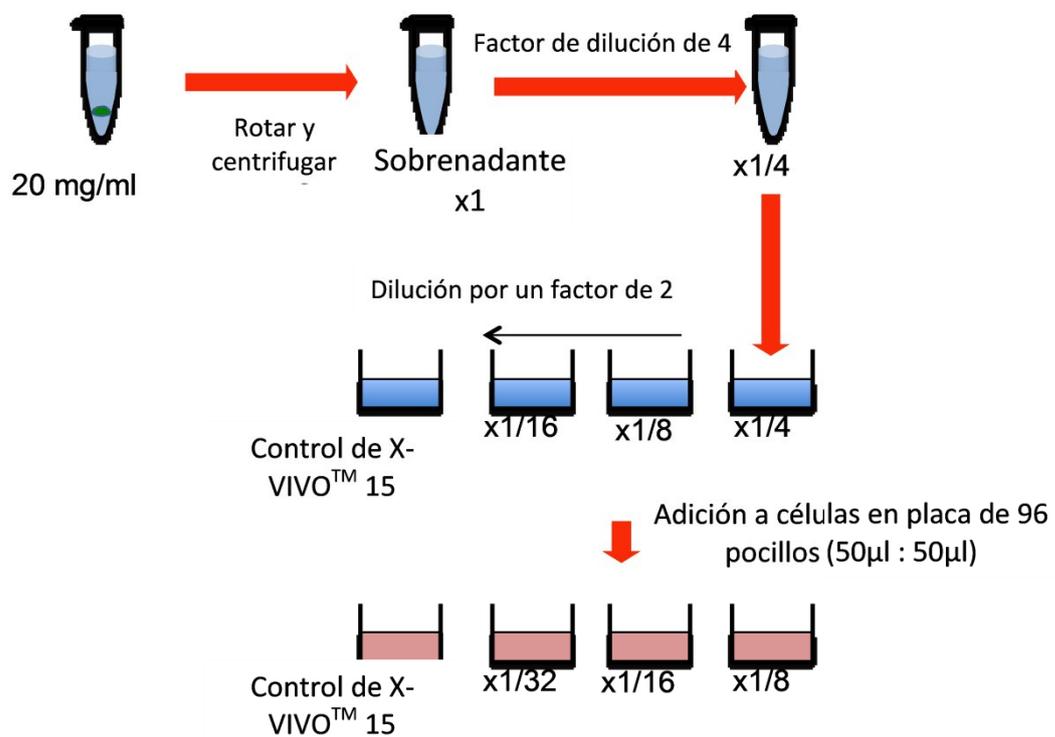


b) En el caso de los productos insolubles en X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



Apéndice 3.6**ESQUEMA DEL MÉTODO DE DISOLUCIÓN DEL 4-NBB PARA EL TESTIGO POSITIVO DEL ENSAYO IL-8 LUC**

Testigo positivo: 4-NBB (insoluble en X-VIVO™ 15)



».

9) En la parte C, se añaden los siguientes capítulos:

«C.52. ENSAYO AMPLIADO DE REPRODUCCIÓN DE MEDAKA EN UNA GENERACIÓN (MEOGRT)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 240 de la OCDE (2015). El ensayo ampliado de reproducción de medaka en una generación (MEOGRT, *Medaka Extended One Generation Test*) describe un método de ensayo completo con peces expuestos a lo largo de varias generaciones para ofrecer datos pertinentes sobre el peligro ecológico y la evaluación del riesgo de los productos, incluidos los alteradores endocrinos sospechosos. La exposición en el MEOGRT continúa hasta la eclosión (hasta dos semanas tras la fertilización, stf). Se necesitarían investigaciones adicionales para justificar la utilidad de ampliar la generación F2 más allá de la eclosión; por el momento no se dispone de información suficiente para establecer condiciones o criterios pertinentes que justifiquen la ampliación de la generación F2. No obstante, este método de ensayo puede actualizarse a medida que se vayan teniendo en cuenta nuevos datos e información. Por ejemplo, en determinadas circunstancias (como en caso de productos con alto potencial de bioconcentración o indicios de efectos transgeneracionales en otros taxones) puede ser útil disponer de orientaciones sobre la ampliación de la generación F2 a través de la reproducción. Este método de ensayo puede utilizarse para evaluar en los peces los posibles efectos crónicos de los productos, incluidos los posibles alteradores endocrinos. El método hace hincapié principalmente en los posibles efectos pertinentes de la población (en particular, los efectos adversos sobre la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento y la reproducción) a efectos de cálculo de una concentración sin efecto observado (NOEC) o una concentración con efecto (CEX), aunque hay que señalar que los enfoques con CEX rara vez son adecuados para grandes estudios de este tipo, en los que el aumento del número de concentraciones de ensayo para permitir la determinación de la CEX deseada puede resultar poco práctico, y también puede causar problemas importantes en materia de bienestar de los animales debido al gran número de animales utilizados. En el caso de los productos que no requieren evaluación a lo largo de “varias generaciones” o en el de los productos que no son posibles alteradores endocrinos, pueden ser más adecuados otros métodos de ensayo (1). El medaka japonés es la especie adecuada para el presente método de ensayo, dado su breve ciclo de vida y la posibilidad de determinar su sexo genético (2), que se considera un componente fundamental de este método de ensayo. Los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método son aplicables al medaka japonés únicamente. Es posible adaptar otras especies de peces pequeños (por ejemplo, el pez cebra) a un protocolo de ensayo similar.

2. Este método de ensayo mide varios parámetros biológicos. Se hace hincapié principalmente en los posibles efectos adversos sobre parámetros pertinentes para la población, como la supervivencia, el desarrollo macroscópico, el crecimiento y la reproducción. En segundo lugar, a fin de proporcionar información sobre el mecanismo y establecer un vínculo entre los resultados de otros tipos de estudios de campo y de laboratorio, cuando se dispone de pruebas *a posteriori* sobre un producto con posible actividad de alteración endocrina (por ejemplo, actividad androgénica o estrogénica en otras pruebas y ensayos), se obtiene otra información útil midiendo el ARNm de la vitelogenina (*vtg*) (o la proteína vitelogenina, VTG), los caracteres sexuales secundarios (CSS) fenotípicos en relación con el sexo genético, y evaluando el examen histopatológico. Cabe señalar que, si un producto problema o sus metabolitos no son sospechosos de ser alteradores endocrinos, puede que no sea necesario medir estos parámetros secundarios y entonces sería más adecuado recurrir a estudios con un uso menos intensivo de recursos y de animales (1). Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Debido al número limitado de productos sometidos a ensayo y de laboratorios implicados en la validación de este ensayo, que es bastante complejo, se prevé que, cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño del estudio, se examinará el método de ensayo y, en caso necesario, se modificará a la luz de la experiencia adquirida. Los datos pueden utilizarse al nivel 5 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos (3). El método de ensayo comienza exponiendo el pez adulto (la generación F0) al producto problema durante la fase de reproducción. La exposición continúa a través del desarrollo y la reproducción de la generación F1 y la eclosión de la generación F2; por lo tanto, el ensayo permite la evaluación de las rutas endocrinas, tanto las estructurales como las que dependen de una activación. Al interpretar los parámetros relacionados con el sistema endocrino se podrá adoptar un enfoque de ponderación de las pruebas.
4. El ensayo debe incluir un número adecuado de individuos para garantizar la suficiente potencia a efectos de la evaluación de los parámetros pertinentes para la reproducción (véase el apéndice 3), al tiempo que se garantiza que el número de animales utilizados es el mínimo necesario por razones de bienestar de los animales. Teniendo en cuenta el gran número de animales de ensayo utilizados, es importante considerar cuidadosamente la necesidad de realizar el ensayo teniendo en cuenta los datos existentes, que ya pueden contener información pertinente sobre muchos de los parámetros del MEOGRT. Puede obtenerse ayuda a este respecto en el marco de ensayos de toxicidad con peces de la OCDE (1).

5. El método de ensayo se ha diseñado principalmente para distinguir los efectos de una sola sustancia. Sin embargo, si ha de realizarse el ensayo con una mezcla, hay que considerar entonces si va a proporcionar resultados adecuados para la finalidad normativa prevista.
6. Antes de iniciar el ensayo, es importante disponer de información sobre las propiedades fisicoquímicas del producto problema, en particular para permitir la obtención de soluciones estables del producto. También es necesario disponer de un método analítico suficientemente sensible para verificar las concentraciones del producto problema.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se inicia el ensayo exponiendo machos y hembras sexualmente maduros (de al menos 12 stf) que forman parejas de cría, a lo largo de 3 semanas, durante las cuales el producto problema se distribuye en el organismo de la generación parental (F0) según su comportamiento toxicocinético. Lo más cerca posible del primer día de la cuarta semana, se recogen los huevos para iniciar la generación F1. Durante la crianza de la generación F1 (un total de 15 semanas), se evalúan la capacidad de eclosión y la supervivencia. Además, se toman muestras de peces de 9-10 stf o para estudiar sus parámetros de desarrollo, y se evalúa el desove durante tres semanas, de la semana 12 a la 14 (stf). Se inicia una generación F2 después de la tercera semana de evaluación de la reproducción y se cría hasta la finalización de la eclosión.

CRITERIOS DE VALIDEZ DEL ENSAYO

8. Se aplicarán los siguientes criterios de validez del ensayo:
 - La concentración de oxígeno disuelto ha de ser ≥ 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;
 - La temperatura media del agua a lo largo de toda la duración del estudio debe situarse entre 24 °C y 26 °C; las eventuales desviaciones de la media en los distintos acuarios no deben superar los 2 °C;
 - La fecundidad media de los testigos en cada una de las generaciones (F0 y F1) debe ser superior a 20 huevos por pareja y día. La fertilidad de todos los huevos producidos durante la evaluación debe ser superior al 80 %. Además, 16 de las 24 parejas de cría testigo recomendadas (> 65 %) deben producir más de 20 huevos por pareja y por día;
 - La capacidad de eclosión de los huevos debe ser ≥ 80 % (media) en los testigos (en cada generación F1 y F2);

- La supervivencia tras la eclosión hasta 3 stf y desde 3 stf hasta la finalización en el caso de la generación F1 (es decir, 15 stf) debe ser ≥ 80 % (media) y ≥ 90 % (media), respectivamente, en los testigos (F1);
- Debe disponerse de pruebas para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos.

En cuanto a la temperatura del agua, aunque no es un criterio de validez, las réplicas de un tratamiento no deben ser estadísticamente diferentes entre sí, y los grupos de tratamiento dentro del ensayo no deben ser estadísticamente diferentes entre sí (sobre la base de las mediciones diarias de temperatura, y excluidas las eventuales desviaciones breves).

9. Aunque puede observarse una disminución de la reproducción en los grupos de exposición más elevada, la reproducción, al menos en el grupo de la tercera exposición más alta y en todos los grupos de exposición inferior de F0, debe ser suficiente para llenar las incubadoras de eclosión. Además, debe haber una adecuada supervivencia embrionaria en el grupo de la tercera exposición más alta y en los grupos de exposición inferior de F1 para permitir la evaluación de los parámetros en el muestreo de subadultos (véanse los puntos 36 y 38 y el apéndice 9). Además, debe haber al menos una supervivencia mínima tras la eclosión (~ 20 %) en el grupo de la segunda exposición más alta de F1. No se trata de criterios de validez en sí, sino de recomendaciones para permitir el cálculo de NOEC sólidas.
10. Si se observa una desviación de los criterios de validez del ensayo, se deben tener en cuenta las consecuencias en relación con la fiabilidad de los datos del ensayo y dichas desviaciones y consideraciones deben incluirse en el informe del ensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

11. Se emplea el equipo común de laboratorio y, en particular:
 - a) medidores de oxígeno y pH;
 - b) equipo para determinar la dureza y la alcalinidad del agua;
 - c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, con supervisión preferiblemente continua;
 - d) recipientes de material químicamente inerte y con una capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el apéndice 3);
 - e) una balanza suficientemente exacta (esto es, exactitud de $\pm 0,5$ mg).

Agua

12. Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo muestre unas tasas de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación del producto problema) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Se debe proceder a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de los aniones y cationes principales (p. ej., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), plaguicidas, carbono orgánico total y sólidos en suspensión, por ejemplo cada seis meses cuando se sepa que el agua de dilución es de calidad relativamente constante. En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable. El pH del agua debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH.

Sistema de exposición

13. No se especifican el diseño ni los materiales utilizados para el sistema de exposición. Para la construcción del sistema de ensayo debe utilizarse vidrio, acero inoxidable u otro material químicamente inerte que no haya sido contaminado en ensayos previos. A los efectos del presente ensayo, un sistema de exposición adecuado puede consistir en un sistema de flujo continuo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Soluciones de ensayo

14. La solución madre del producto problema debe introducirse en el sistema de exposición mediante una bomba adecuada. El caudal de la solución madre debe calibrarse de acuerdo con la confirmación analítica de las soluciones de ensayo antes del inicio de la exposición, y comprobarse volumétricamente con regularidad durante el ensayo. La solución de ensayo en cada cámara se renueva adecuadamente (por ejemplo, un mínimo de 5 renovaciones y hasta 16 renovaciones de volumen al día o hasta 20 ml/min de flujo) en función de la estabilidad del producto problema y de la calidad del agua.
15. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferentemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución por medios mecánicos (p. ej., mediante un agitador o ultrasonidos). Para lograr la concentración adecuada de la solución madre pueden emplearse columnas o sistemas de saturación o métodos de administración pasiva (14). Deben hacerse todos los esfuerzos posibles para evitar tener que recurrir a disolventes o vehículos por los siguientes motivos: 1) El uso de determinados disolventes puede desembocar en toxicidad o en respuestas indeseables o imprevistas; 2) la concentración de productos problema por encima de su hidrosolubilidad (como puede

ocurrir con frecuencia si se utilizan disolventes) puede hacer que sean inexactas las determinaciones de las concentraciones efectivas; 3) el uso de disolventes en ensayos a largo plazo puede dar lugar a la formación de “biopelícula” en un grado significativo, asociada con una actividad microbiana que puede afectar a las condiciones medioambientales, así como a la capacidad de mantener las concentraciones de exposición, y 4) a falta de datos históricos que demuestren que el disolvente no influye en los resultados del estudio, el uso de disolventes impone la realización de un control del disolvente con implicaciones para el bienestar de los animales, ya que han de utilizarse más animales para llevar a cabo el ensayo. En caso de productos difíciles de ensayar, es posible utilizar un disolvente como último recurso, y debe consultarse el documento de orientación 23 de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (*Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (15). La elección del disolvente debe venir determinada por las propiedades químicas del producto problema y por la disponibilidad de datos históricos sobre el uso del disolvente. Si se utilizan vehículos disolventes, deben evaluarse controles adecuados del disolvente además de los testigos sin disolventes (negativos) (únicamente con el agua de dilución). En caso de que sea inevitable la utilización de un disolvente, y de que se encuentre actividad microbiana (biopelícula), se recomienda registrar/comunicar la formación de biopelícula por recipiente (al menos una vez por semana) a lo largo de todo el ensayo. Lo ideal es que la concentración de disolvente se mantenga constante en el control del disolvente y en todos los tratamientos de ensayo. Si la concentración del disolvente no se mantiene constante, en el control del disolvente debe utilizarse la mayor concentración de disolvente que se encuentre en el tratamiento de ensayo. En los casos en que se utilicen vehículos disolventes, las concentraciones máximas de disolvente no deben superar los 100 µl/l o 100 mg/l (15), y se recomienda mantener la concentración de disolvente lo más baja posible (p. ej., < 20 µl/l) para evitar cualquier posible efecto del disolvente sobre los parámetros medidos (16).

Animales de experimentación

Selección y mantenimiento de los peces

16. La especie estudiada es el medaka japonés (*Oryzias latipes*), debido a su breve ciclo de vida y a la posibilidad de determinar su sexo genético. Aunque otras especies de peces pequeños pueden adaptarse a un protocolo de ensayo similar, los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método de ensayo son aplicables únicamente al medaka japonés (véase el punto 1). El medaka se induce fácilmente a criar en cautividad; existen métodos publicados para su cría (17) (18) (19), y se dispone de datos de ensayos sobre letalidad a corto plazo, de las primeras fases de la vida y de todo el ciclo de vida (5) (6) (8) (9) (20). Todos los peces se mantienen en un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Los peces se alimentan con nauplios vivos de artemia salina (*Artemia*

spp.), que pueden complementarse en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio. Debe analizarse periódicamente la presencia de contaminantes en la comida en copos disponible en el comercio.

17. En la medida en que se sigan las prácticas zootécnicas adecuadas, no será necesario un protocolo de cultivo específico. Por ejemplo, el medaka se puede criar en recipientes de 2 l con 240 larvas de peces por recipiente hasta 4 stf y luego pueden criarse en recipientes de 2 l con 10 peces por recipiente hasta 8 stf, en cuyo momento se pasa a parejas de cría en recipientes de 2 l.

Aclimatación y selección de los peces

18. Los peces de ensayo deben seleccionarse a partir de una única población de laboratorio que se haya aclimatado durante al menos dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad de agua e iluminación similares a las del ensayo (Nota: Este período de aclimatación no es un período de exposición previa *in situ*). Se recomienda que los peces de ensayo se obtengan de un cultivo interno, ya que el transporte de peces adultos es estresante y puede interferir con la fiabilidad del desove. Los peces deben ser alimentados con nauplios de artemia salina dos veces al día durante todo el período de mantenimiento y durante la fase de exposición, con el complemento, en caso necesario, de comida en copos disponible en el comercio. Para iniciar este ensayo se considera necesario un mínimo de 42 parejas de cría (54 parejas de cría si hace falta un control del disolvente debido, en parte, a la falta de datos históricos para apoyar el uso de solo el control sin disolvente) a fin de garantizar una replicación adecuada. Además, debe verificarse que cada pareja de cría de F0 sea XX-XY (es decir, el complemento normal de los cromosomas sexuales en cada sexo) a fin de evitar la posible inclusión de machos XX espontáneos (véase el punto 39).
19. Durante la fase de aclimatación, se registrará la mortalidad entre los peces del cultivo y se aplicarán los siguientes criterios tras un período de adaptación de 48 horas:
- Si la mortalidad es superior al 10 % de la población del cultivo en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se rechaza todo el lote;
 - Si la mortalidad está entre el 5 % y el 10 % de la población en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se prolonga la aclimatación durante siete días adicionales al período de aclimatación de 2 semanas; si durante este segundo período de siete días la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote,
 - Si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se acepta el lote.
20. Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el período de aclimatación de dos semanas antes del ensayo ni durante el período de exposición, y los

tratamientos terapéuticos deben evitarse completamente si es posible. No deben utilizarse en el estudio peces con signos clínicos de enfermedad. Debe mantenerse un registro de observaciones y de los eventuales tratamientos profilácticos y terapéuticos durante el período de cultivo anterior al ensayo.

21. La fase de exposición debe comenzar con peces adultos con sexo genéticamente asignado y sexualmente dimorfos, procedentes de un suministro de laboratorio de animales maduros para la reproducción, cultivados a 25 ± 2 °C. Los peces deben estar identificados como reproductores acreditados (es decir, que hayan producido crías viables) durante la semana anterior a la exposición. En todo el grupo de peces utilizados en el ensayo, los pesos individuales por sexo al inicio del ensayo deben mantenerse en el intervalo de ± 20 % de la media aritmética del peso del mismo sexo. Antes del ensayo debe pesarse una submuestra de peces para calcular el peso medio. Los peces seleccionados deben ser como mínimo de 12 stf, con un peso ≥ 300 mg en el caso de las hembras y ≥ 250 mg en el caso de los machos.

DISEÑO DEL ENSAYO

Concentraciones de ensayo

22. Se recomienda utilizar cinco concentraciones del producto más el testigo o testigos. Deben tenerse en cuenta todas las fuentes de información a la hora de seleccionar el intervalo de concentraciones de ensayo, incluidas las relaciones cuantitativas entre actividad y estructura (QSAR), la extrapolación a partir de análogos, los resultados de ensayos con peces, como los ensayos de toxicidad aguda (capítulo C.1 del presente anexo), el ensayo de reproducción de peces a corto plazo (capítulo C.48 del presente anexo) y otros métodos de ensayo como, por ejemplo, los capítulos C.15, C.37, C.41, C.47 o C.49 del presente anexo (21) (22) (23) (24) (25) si se dispone de ellos o, en caso necesario, de un ensayo de determinación del intervalo, con la posible inclusión de una fase de reproducción. Si es necesario, el ensayo de determinación del intervalo puede realizarse en condiciones (calidad del agua, sistema de ensayo, carga de animales) similares a las utilizadas para el ensayo definitivo. Si es necesario utilizar un disolvente y no se dispone de datos históricos, puede utilizarse el ensayo de determinación del intervalo para identificar la idoneidad del disolvente. La concentración de ensayo más elevada no debe superar la solubilidad en agua, 10 mg/l o 1/10 de la CL50 a las 96 h (27). La concentración más baja debe estar separada de la concentración más alta por un factor de entre 10 y 100 veces. El uso de cinco concentraciones en este ensayo permite no solo medir las relaciones dosis-respuesta, sino también la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la NOEC, que son necesarias para la evaluación del riesgo en algunos programas normativos o jurisdicciones. En general, el factor de separación entre concentraciones nominales del producto problema entre niveles de tratamiento adyacentes es $\leq 3,2$.

Réplicas dentro de los grupos de tratamiento y testigos

23. Debe utilizarse un mínimo de seis cámaras de ensayo replicadas por concentración de ensayo (véase el apéndice 7). Durante la fase de reproducción (excepto la generación F0), la estructura de replicación se duplica para la evaluación de la fecundidad y cada réplica solo tiene una pareja de cría (véase el punto 42).
24. Además de las concentraciones de ensayo, deben someterse a ensayo un testigo del agua de dilución y, en caso necesario, un control del disolvente. Para garantizar una potencia estadística adecuada, debe utilizarse un número doble de cámaras replicadas de los testigos (es decir, deben utilizarse con los testigos al menos doce réplicas). Durante la fase de reproducción, se duplica el número de réplicas de los testigos (es decir, 24 réplicas como mínimo, y cada réplica solo tiene una pareja reproductora). Tras la reproducción, las réplicas de los testigos no deben contener más de 20 embriones (peces).

PROCEDIMIENTO

Inicio del ensayo

25. Los peces adultos activos en cuanto a la reproducción utilizados para iniciar la generación F0 del ensayo se seleccionan según dos criterios: edad (por lo general, más de 12 stf pero se recomienda no superar las 16 stf) y peso (debe ser ≥ 300 mg en las hembras y ≥ 250 mg en los machos).
26. Al inicio del ensayo se traslada una pareja macho-hembra que cumpla las especificaciones anteriores, como pareja aparte, a cada réplica de los recipientes, es decir, a doce réplicas de los testigos y seis réplicas de los tratamientos del producto. A estos recipientes se les asigna al azar un tratamiento (por ejemplo, T1-T5 y testigo) y una réplica (por ejemplo, A-L en los testigos y A-F en el tratamiento), y después se colocan en el sistema de exposición con el flujo adecuado a cada recipiente.

Condiciones de exposición

27. En el apéndice 3 figura un resumen completo de los parámetros y condiciones del ensayo. El cumplimiento de estas especificaciones debe hacer que los peces testigo den unos valores de los parámetros similares a los que figuran en el apéndice 4.
28. Durante el ensayo, debe medirse el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura en al menos un recipiente de ensayo de cada grupo de tratamiento y el testigo. Como mínimo, estas mediciones, excepto las de la temperatura, deben efectuarse una vez por semana durante todo el tiempo de exposición. La temperatura media del agua durante toda la duración del estudio debe situarse entre 24 °C y 26 °C a lo largo de todo el ensayo. La temperatura debe medirse cada día durante todo el período de exposición. El pH del agua debe mantenerse

entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH. Las réplicas dentro de un tratamiento no deben ser estadísticamente diferentes entre sí, y los grupos de tratamiento dentro del ensayo no deben ser estadísticamente diferentes entre sí (sobre la base de las mediciones diarias de temperatura, y excluidas las eventuales desviaciones breves).

Duración de la exposición

29. El ensayo expone a peces sexualmente reproductores de la F0 durante tres semanas. En la semana 4, aproximadamente el día 24 del ensayo, se establece la F1 y las parejas de cría de la F0 se sacrifican de forma compasiva y se registran el peso y la talla (véase el punto 34). A ello sigue la exposición de la generación F1 durante 14 semanas más (un total de 15 semanas para F1) y la de la generación F2 durante dos semanas hasta la eclosión. La duración total del ensayo es en principio de 19 semanas (es decir, hasta la eclosión de la F2). El calendario del ensayo se muestra en el cuadro 2 y se explica con más detalle en el apéndice 9.

Régimen de alimentación

30. Los peces pueden alimentarse con nauplios de 24 h de edad de artemia salina (*Artemia* spp.) *ad libitum*, complementados en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio. Esta comida en copos disponible en el comercio debe analizarse periódicamente en cuanto a la presencia de contaminantes, tales como los plaguicidas organoclorados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o los policlorobifenilos (PCB). Debe evitarse la comida que tenga un nivel elevado de sustancias con actividad endocrina (es decir, fitoestrógenos) que puedan poner en peligro la respuesta del ensayo. La comida sobrante y la materia fecal deben retirarse de los recipientes de ensayo de la forma necesaria, por ejemplo limpiando bien el fondo de cada recipiente con un sifón. Los lados y el fondo de cada recipiente deben limpiarse también una o dos veces por semana (por ejemplo, raspando con una espátula). En el apéndice 5 figura un ejemplo de calendario de alimentación. La dosis alimentaria se basa en el número de peces por réplica. Por lo tanto, la dosis alimentaria se reduce si se produce mortalidad en una réplica.

Determinación analítica y mediciones

31. Antes de que comience el período de exposición, debe garantizarse el funcionamiento correcto del sistema de distribución del producto. Deben estar bien establecidos todos los métodos analíticos necesarios, incluidos los conocimientos suficientes sobre la estabilidad del producto en el sistema de ensayo. Durante el ensayo, las concentraciones del producto problema se determinan a intervalos apropiados, de preferencia al menos cada semana en una réplica de cada grupo de tratamiento, rotando cada semana entre las réplicas del mismo grupo de tratamiento.

32. Durante el ensayo, los caudales de diluyente y de solución madre deben comprobarse a intervalos adecuados (por ejemplo, un mínimo de tres veces por semana). Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de producto problema en la solución se ha mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de $\pm 20\%$ de la media de los valores medidos durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse entonces en los valores nominales o en los valores medidos. En caso de productos que se acumulan considerablemente en los peces, las concentraciones de ensayo pueden disminuir a medida que crecen los peces. En tales casos, se recomienda adaptar la tasa de renovación de la solución de ensayo en cada cámara para mantener la concentración de ensayo lo más constante posible.

Observaciones y parámetros medidos

33. Los parámetros medidos incluyen la fecundidad, la fertilidad, la eclosión, el crecimiento y la supervivencia para la evaluación de los posibles efectos a nivel de población. Los comportamientos también deben ser objeto de observaciones diarias, y debe registrarse todo comportamiento anómalo. Entre otros parámetros sobre el mecanismo se incluyen los niveles hepáticos de ARNm *vtg* o de la proteína VTG medidos con un inmunoanálisis (28), los marcadores fenotípicos sexuales tales como las características papilas de la aleta anal de los machos, la evaluación histológica del sexo gonadal y la evaluación histopatológica del riñón, hígado y gónadas (véase la lista de parámetros del cuadro 1). Todos estos parámetros específicos se evalúan en el contexto de la determinación del sexo genético del individuo, sobre la base de la presencia o ausencia del gen *dmy*, que determina el sexo masculino del medaka (véase el punto 41). Además, también se evalúa el tiempo hasta desovar. Por otra parte, pueden obtenerse las proporciones simples de sexos fenotípicos a partir de la información procedente de los recuentos de papilas de la aleta anal para definir cada espécimen de medaka como fenotípicamente macho o hembra. No se espera que este método de ensayo detecte desviaciones moderadas de la proporción prevista de sexos, ya que el número relativamente pequeño de peces por réplica no proporciona la suficiente potencia estadística. Asimismo, durante la evaluación histopatológica, se evalúa la gónada y se realizan análisis mucho más potentes para evaluar el fenotipo de las gónadas en el contexto del sexo genético.
34. El objetivo principal de este método de ensayo es evaluar los posibles efectos de un producto problema pertinentes para la población. Los parámetros sobre el mecanismo (VTG, CSS y determinados efectos histopatológicos en las gónadas) también pueden ayudar a determinar si algún efecto se ha mediado a través de la actividad endocrina. Sin embargo, estos parámetros sobre el mecanismo pueden verse influidos también por las toxicidades sistémicas y de otro tipo. Por lo tanto, también puede evaluarse detalladamente la histopatología hepática y renal para ayudar a comprender mejor las eventuales respuestas en los parámetros sobre el mecanismo. No obstante, si no se llevan a cabo estas

evaluaciones detalladas, deben observarse y registrarse las anomalías macroscópicas observadas casualmente durante la evaluación histopatológica.

Sacrificio compasivo de los peces

35. A la terminación de la exposición de las generaciones F0 y F1 y cuando se submuestran peces subadultos, los peces deben sacrificarse compasivamente con cantidades adecuadas de solución anestésica (por ejemplo, metanosulfonato de triclaína, MS-222, n.º CAS 886-86-2, 100-500 mg/l) amortiguada con solución de NaHCO₃ 300 mg/l (bicarbonato de sodio, n.º CAS 144-55-8) para reducir la irritación de las mucosas. Si los peces muestran signos de sufrimiento considerable (que sea muy intenso, y que pueda predecirse de manera fiable la muerte) y se consideran moribundos, los animales deben anestesiarse y sacrificarse de forma compasiva, y estos casos deben tratarse como mortalidad a efectos del análisis de los datos. Cuando se sacrifica un pez debido a la morbilidad, este extremo debe tenerse en cuenta y registrarse. En función del momento en que se sacrifique el pez durante el estudio, se puede conservar el pez para llevar a cabo un análisis histopatológico (fijando el pez con vistas al posible estudio de su histopatología).

Manipulación de los huevos y larvas de los peces

Recogida de los huevos de las parejas de cría para propagar la siguiente generación

36. La recogida de los huevos se realiza el primer día (o los primeros dos días, si es necesario) de la semana de ensayo 4 para pasar de F0 a F1, y de la semana de ensayo 18 para pasar de F1 a F2. La semana de ensayo 18 corresponde a peces adultos de la generación F1, de 15 stf (semanas tras la fertilización). Es importante retirar todos los huevos que haya en cada recipiente el día anterior a la fecha de recogida de los huevos, a fin de garantizar que todos los huevos recogidos de una pareja de cría proceden de un solo desove. Tras el desove, en ocasiones, el medaka hembra transporta sus huevos cerca de la cloaca hasta que puede depositarlos en la superficie de un sustrato. Si no hay ningún sustrato presente en el recipiente, los huevos pueden encontrarse sujetos a la hembra o al fondo del recipiente. En función de su ubicación, los huevos se retiran cuidadosamente de la hembra o se toman con sifón del fondo en la semana de ensayo 4 de F0 y en la semana de ensayo 18 de F1. Todos los huevos recogidos dentro de un tratamiento se ponen en común antes de su distribución en cámaras de incubación.
37. Deben eliminarse los filamentos de huevos, que mantienen juntos los huevos desovados. Se recogen huevos fertilizados (hasta 20) de cada pareja de cría (1 pareja por réplica), se mezclan los de un mismo tratamiento y se distribuyen sistemáticamente en cámaras de incubación adecuadas (apéndices 6 y 7). Utilizando un microscopio de disección de buena calidad, se pueden ver signos distintivos de las primeras etapas de la fertilización/desarrollo, como la formación de la membrana de fertilización (corion), la

división celular en curso o la formación de la blástula. Las cámaras de incubación podrán instalarse en “acuarios de incubación” separados para cada tratamiento (en cuyo caso deberán medirse en estos los parámetros de calidad del agua y las concentraciones del producto problema), o en el acuario paralelo en el que se incluirán las larvas que hayan eclosionado (por ejemplo, embriones libres). Si es necesario un segundo día de recogida (día de ensayo 23), todos los huevos de ambos días deberán mezclarse y redistribuirse sistemáticamente en cada una de las réplicas de tratamiento.

Cría de los huevos hasta la eclosión

38. Los huevos fertilizados se agitan continuamente, por ejemplo dentro de la incubadora de huevos mediante burbujeo de aire o balanceando verticalmente la incubadora de huevos. La mortalidad de los huevos fertilizados (embriones) se comprueba y registra diariamente. Los huevos muertos se retiran de las incubadoras (apéndice 9). En el 7.º día tras la fertilización (dtf), la agitación se detiene o se reduce, de modo que los huevos fertilizados se depositen en el fondo de la incubadora. Esto fomenta la eclosión, normalmente a lo largo de uno o dos días más. Respecto a cada tratamiento y cada testigo, se cuentan los animales eclosionados (larvas jóvenes, embriones libres) respecto a las réplicas mezcladas. Los huevos fertilizados que no hayan eclosionado en un período del doble del día mediano de eclosión del testigo (normalmente 16 o 18 dtf) se consideran inviables y se desechan.
39. Se transfieren doce animales eclosionados a cada recipiente replicado. Los animales que han eclosionado de las cámaras de incubación se mezclan y se distribuyen sistemáticamente entre los recipientes replicados (apéndice 7). Esto puede efectuarse seleccionando aleatoriamente un animal eclosionado de la mezcla de tratamiento para añadirlo de forma aleatoria a un acuario replicado. Cada uno de los recipientes debe contener un número igual ($n = 12$) de larvas eclosionadas (como máximo, 20 larvas cada uno). Si no hay suficientes animales eclosionados como para llenar todas las réplicas de tratamiento, se recomienda velar por que el mayor número posible de réplicas tenga 12 de estos animales. Los animales eclosionados pueden manipularse de manera segura con pipetas de vidrio de orificio grande. Los demás animales eclosionados se sacrifican de forma compasiva con anestesia. Durante las semanas previas a la configuración de las parejas de cría, debe registrarse el día en que se produzca el primer desove en cada réplica.

Configuración de las parejas de cría

Recorte de las aletas y determinación del sexo genotípico

40. Se determina el sexo genotípico recortando las aletas a las 9-10 stf (es decir, en la semana de ensayo 12-13 en el caso de la generación F1). Se anestesian todos los peces dentro de un recipiente (utilizando métodos aprobados, por ejemplo del IACUC) y se toma una pequeña muestra de tejido de la parte dorsal o ventral de la aleta caudal de cada pez para

determinar el sexo genotípico del individuo (29). Los peces de una réplica pueden alojarse en jaulas pequeñas, si es posible uno por jaula, en el recipiente replicado. También es posible mantener dos peces en cada jaula siempre que se distingan uno del otro. Un método consiste en cortar de forma diferente la aleta caudal (por ejemplo, de uno se corta la punta ventral y del otro la dorsal) al tomar la muestra de tejido.

41. El sexo genotípico del medaka se determina mediante la identificación y secuenciación de un gen (*dmy*) que se encuentra en el cromosoma Y. La presencia de *dmy* indica un individuo XY, sea cual sea el fenotipo, mientras que la ausencia de *dmy* indica un individuo XX, sea cual sea el fenotipo (30) (31). Se extrae ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada recorte de aleta y la presencia o ausencia de *dmy* puede determinarse mediante métodos de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (véase el apéndice 9 del capítulo C.41 del presente anexo, o los apéndices 3 y 4 de la referencia 29).

Establecimiento de las parejas de cría

42. La información sobre el sexo genotípico se utiliza para establecer parejas de cría XX-XY con independencia del fenotipo externo, que puede estar alterado por la exposición a un producto problema. El día siguiente al de la determinación del sexo genotípico de cada pez, se seleccionan al azar dos peces XX y dos XY de cada réplica, y se establecen dos parejas de cría XX-XY. Si una réplica no tiene dos peces XX o dos peces XY, deben obtenerse los peces adecuados de otras réplicas dentro del tratamiento. La prioridad es tener el número recomendado de parejas de cría replicadas (12) en cada tratamiento y en los testigos (24). A la hora de establecer parejas de cría deben excluirse los peces con anomalías evidentes (problemas de la vejiga natatoria, malformaciones vertebrales, variaciones extremas de tamaño, etc.). Durante la fase de reproducción de F1, cada recipiente en paralelo debe contener una sola pareja de cría.

Muestreo de los subadultos y evaluación de los parámetros

Muestreo de los peces no incluidos en las parejas de cría

43. Tras la configuración de las parejas de cría, los peces no seleccionados para la reproducción posterior se sacrifican de forma compasiva para la medición de los parámetros de los subadultos en la semana de ensayo 12-13 (F1). Es muy importante que los peces se manipulen de tal manera que pueda seguir asignándose a cada pez el sexo genotípico determinado para la selección de las parejas de cría. Todos los datos recogidos se analizan en el contexto del sexo genotípico del pez específico. Cada pez se utiliza para diversas mediciones de parámetros, entre las que se incluyen las siguientes: determinación de las tasas de supervivencia de los peces juveniles/subadultos [semanas de ensayo 7-12/13 (F1)], crecimiento de la longitud [puede medirse la longitud estándar si se ha acortado la aleta caudal debido a un muestreo para el análisis del sexo genético; puede medirse la

longitud total si solo se ha tomado una porción de la aleta caudal (dorsal o ventral) en el muestreo para detectar la presencia de *dmy*] y la masa corporal (es decir, peso húmedo, tras secar con material absorbente), ARNm de *vtg* (o VTG) y papilas de la aleta anal (véanse los cuadros 1 y 2). Obsérvese que también han de medirse los pesos y longitudes de las parejas de cría para calcular el crecimiento medio de un grupo de tratamiento.

Muestreo de los tejidos y medición de la vitelogenina

44. El hígado se disecciona y se conserva a una temperatura ≤ -70 °C hasta que se realicen las mediciones del ARNm *vtg* (o de VTG). La cola de los peces, incluida la aleta anal, se conserva en un fijador adecuado (por ejemplo, el de Davidson) o se fotografía de manera que puedan contarse en una fecha posterior las papilas de la aleta anal. Si se desea, en ese momento pueden muestrearse y conservarse otros tejidos (es decir, las gónadas). Debe cuantificarse la concentración de VTG en el hígado con una técnica ELISA homóloga (véanse los procedimientos recomendados para el medaka en el apéndice 6 del capítulo C.48 del presente anexo). Como alternativa, la EPA de EE. UU. ha establecido los métodos para la cuantificación del ARNm *vtg*, es decir, la extracción del ARNm del gen *vtg I* de una muestra de hígado y la cuantificación del número de copias del gen *vtg I* (por ng de ARNm total) mediante RCP cuantitativa (29). En lugar de determinar el número de copias del gen *vtg* en los grupos testigo y de tratamiento, un método que consume menos recursos y es menos difícil técnicamente es el de determinar el cambio relativo (número de veces) de la expresión de *vtg I* de los grupos testigo y de tratamiento.

Características sexuales secundarias

45. En circunstancias normales, solo el medaka macho sexualmente maduro tiene papilas, que se desarrollan en los segmentos de determinados radios de la aleta anal como una característica sexual secundaria, proporcionando un biomarcador potencial de los efectos de alteración endocrina. En el apéndice 8 figura el método de recuento de las papilas de la aleta anal (el número de segmentos con papilas). También se utiliza el número de papilas de la aleta anal por individuo para clasificar al individuo como macho o hembra fenotípico externamente a fin de calcular una proporción simple de sexos por réplica. Se definen como machos los medakas con cualquier número de papilas superior a 0; se definen como hembras los medakas con 0 papilas de la aleta anal.

Evaluación de la fecundidad y de la fertilidad

46. La fecundidad y la fertilidad se evalúan en las semanas de ensayo 1 a 3 en la generación F0 y en las semanas de ensayo 15 a 17 en la generación F1. Se recogen diariamente los huevos de cada pareja de cría durante 21 días consecutivos. Cada mañana, los huevos se retiran suavemente de las hembras retenidas en una red y/o se toman con sifón del fondo del acuario. Se registran diariamente tanto la fecundidad como la fertilidad de cada pareja de cría en paralelo. La fecundidad se define como el número de huevos desovados y la

fertilidad se define funcionalmente como el número de huevos fertilizados y viables en el momento del recuento. El recuento debe hacerse lo antes posible tras la recogida de los huevos.

47. La fecundidad de las réplicas se registra diariamente como el número de huevos por pareja de cría que se analiza mediante los procedimientos estadísticos recomendados utilizando las medias de las réplicas. La fertilidad de las réplicas es la suma del número de huevos fértiles producidos por una pareja de cría dividido por la suma del número de huevos producidos por esa pareja. La fertilidad se analiza estadísticamente como una proporción por réplica. La capacidad de eclosión de las réplicas es el número de animales eclosionados dividido por el número de embriones cargados (normalmente 20). La capacidad de eclosión se analiza estadísticamente como una proporción por réplica.

Muestreo de los adultos y evaluación de los parámetros

Muestreo de los peces incluidos en las parejas de cría

48. Tras la semana de ensayo 17 (es decir, después de que se haya iniciado con éxito la generación F2), los adultos F1 se sacrifican de forma compasiva y se evalúan diversos parámetros (véanse los cuadros 1 y 2). Se forman imágenes de la aleta anal para evaluar las papilas de esta (véase el apéndice 8), y/o se retira la cola, inmediatamente por detrás de la cloaca, y se fija para efectuar más tarde el recuento de las papilas. Puede tomarse una muestra de una porción de la aleta caudal y guardarse por el momento para la verificación del sexo genético (*dmy*), si se desea. En caso necesario, puede tomarse una muestra de tejido para repetir el análisis de *dmy* a fin de verificar el sexo genético de los distintos peces. Se abre la cavidad corporal para permitir la perfusión con fijadores adecuados (por ejemplo, el de Davidson) antes de sumergir todo el cuerpo en el fijador. No obstante, si se realiza una fase de permeabilización adecuada antes de la fijación, no es necesario abrir la cavidad corporal.

Histopatología

49. Cada pez se evalúa en cuanto a la histopatología de las gónadas (30) (29). Como se indica en el punto 33, otros parámetros sobre el mecanismo evaluados en este ensayo (es decir, VTG, CSS y determinados efectos histopatológicos en las gónadas) pueden estar influidos por la toxicidad sistémica o de otro tipo. Por lo tanto, la histopatología hepática y renal también puede evaluarse detalladamente para ayudar a comprender mejor las eventuales respuestas en los parámetros sobre el mecanismo. No obstante, si no se llevan a cabo estas evaluaciones detalladas, deben observarse y registrarse las anomalías macroscópicas observadas casualmente durante la evaluación histopatológica. Puede considerarse la “lectura descendiente” desde el grupo de tratamiento más alto (respecto al testigo) hasta un tratamiento sin efecto; sin embargo, se recomienda consultar las orientaciones sobre

histopatología (29). Por lo general, todas las muestras se tratan o se seccionan, tras lo cual las estudia el histopatólogo. Si se utiliza un enfoque de “lectura descendiente”, se señala que la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS) se basa en la expectativa de que, a medida que aumenten los niveles de dosis, también aumentará el impacto biológico (la patología). Por lo tanto, se perderá potencia si únicamente se considera una sola dosis alta sin ninguna dosis intermedia. Si no es necesario el análisis estadístico para determinar que la dosis alta no tiene ningún efecto, entonces puede aceptarse este enfoque. El fenotipo de las gónadas se deriva también de esta evaluación.

Otras observaciones

50. El MEOGRT proporciona datos que pueden utilizarse (por ejemplo, con un enfoque de ponderación de las pruebas) para evaluar simultáneamente al menos dos tipos generales de rutas de resultados adversos (AOP) que desembocan en el deterioro de la función reproductora: a) rutas con intervención endocrina que implican la alteración del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-gónadas (eje HPG), y b) rutas que provocan la reducción de la supervivencia, el crecimiento (longitud y peso) y la reproducción debido a toxicidad sin intervención endocrina. En este ensayo también se incluyen parámetros que se suelen medir en ensayos de toxicidad crónica, tales como el ensayo de todo el ciclo de vida y el ensayo de las primeras fases de la vida, y que pueden utilizarse para evaluar los peligros que plantean los modos tóxicos de acción sin intervención endocrina y las rutas de toxicidad con intervención endocrina. Durante el ensayo, el comportamiento debe ser objeto de observaciones diarias, y debe registrarse todo comportamiento anómalo. Además, debe registrarse la eventual mortalidad y debe calcularse la supervivencia hasta el sacrificio parcial de los peces (semana de ensayo 6/7), la supervivencia tras el sacrificio parcial hasta el muestreo de subadultos (9-10 stf) y la supervivencia desde el emparejamiento hasta el muestreo de peces adultos.

Cuadro 1: Resumen de los parámetros del MEOGRT*

Fase de la vida	Parámetro	Generación
Embriones (2 stf)	Eclosión (% y tiempo hasta la eclosión)	F1, F2
Juveniles (4 stf)	Supervivencia	F1
Subadultos (9 o 10 stf)	Supervivencia	F1
	Crecimiento (longitud y peso)	
	Vitelogenina	

	(ARNm o proteína)	
	Características sexuales secundarias (papilas de la aleta anal)	
	Proporción externa de sexos	
	Tiempo hasta el primer desove	
Adultos (12-14 stf)	Reproducción (fecundidad y fertilidad)	F0, F1
Adultos (15 stf)	Supervivencia	F1
	Crecimiento (longitud y peso)	
	Características sexuales secundarias (papilas de la aleta anal)	
	Histopatología (gónadas, hígado, riñones)	

* Estos parámetros deben analizarse estadísticamente.

CALENDARIO

51. En el cuadro 2 se muestra un calendario del MEOGRT. Este incluye 4 semanas de exposición para los adultos de la generación F0 y 15 semanas de exposición para la generación F1, y el período de exposición para la segunda generación (F2), hasta la eclosión (2 stf). En el apéndice 9 figura un resumen de la actividad a lo largo del MEOGRT.

Cuadro 2: Calendario de exposición y de medición de parámetros del MEOGRT.

Calendario de exposición y parámetros del MEOGRT																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Semana de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Clave de la etapa de la vida	Embriones				Larvas				Juveniles				Subadultos		Adultos				
Parámetros																			
Fecundidad	F ₀														F ₁				
Fertilidad	F ₀														F ₁				
Eclosión					F ₁														F ₂
Supervivencia					F ₁								F ₁						F ₁
Crecimiento				F ₀								F ₁							F ₁
Vitelogenina												F ₁							
Características sexuales secundarias												F ₁							F ₁
Histopatología																			F ₁
Semana de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<ul style="list-style-type: none"> El diseño experimental tiene 7 grupos de réplicas: <ul style="list-style-type: none"> 5 para los tratamientos con el producto problema 2 para los tratamientos testigo (4 si se utiliza disolvente) Diseño dentro del grupo <ul style="list-style-type: none"> 12 réplicas para la reproducción, patología de adultos y CSS (sem. 10 a 18) 6 réplicas para la eclosión, la supervivencia, la Vtg; y CSS y crecimiento de subadultos (sem. 1 a 9) <p>CSS: características sexuales secundarias; Sem.: semanas; Vtg: vitelogenina</p>																			

COMUNICACIÓN DE DATOS

Análisis estadístico

52. Dado que se determina el sexo genotípico de todos los peces del ensayo, los datos deben analizarse aparte por cada sexo genotípico (es decir, machos XY y hembras XX). En caso contrario, se reducirá considerablemente la potencia estadística de cualquier análisis. Es preferible que los análisis estadísticos de los datos sigan los procedimientos descritos en el Documento de la OCDE sobre enfoques actuales del análisis de datos de ecotoxicidad, orientaciones sobre la aplicación (32). El apéndice 10 proporciona más orientaciones para el análisis estadístico.

53. El diseño del ensayo y la selección de las pruebas estadísticas deben aportar una potencia adecuada para detectar los cambios de importancia biológica en los parámetros respecto a los que debe comunicarse una NOEC (32). La comunicación de las concentraciones y parámetros con efectos pertinentes puede depender del marco normativo. Debe identificarse el cambio porcentual en cada uno de los parámetros que sea importante

detectar o estimar. El diseño experimental debe ajustarse para que esto sea posible. No es probable que se aplique la misma variación porcentual a todos los parámetros, y tampoco lo es que se pueda diseñar un experimento factible que cumpla dichas condiciones para todos los parámetros. Por ello es importante centrarse en los parámetros relevantes para el experimento en cuestión a la hora de diseñarlo adecuadamente. En el apéndice 10 se ofrece un diagrama de flujo estadístico y orientaciones para ayudar al tratamiento de los datos y a la elección del ensayo o modelo estadístico más adecuado para su utilización. Se podrán usar otros enfoques estadísticos, siempre que estén científicamente justificados.

54. Será preciso analizar las variaciones dentro de cada serie de réplicas en paralelo mediante procedimientos de análisis de la varianza o tablas de contingencia y se usarán suficientes métodos de análisis estadísticos adecuados en función de los resultados obtenidos. Para realizar una comparación múltiple entre los resultados a cada concentración y los de los testigos, se recomienda seguir el procedimiento de ajuste secuencial (por ejemplo, la prueba de Jonckheere-Terpstra) en caso de respuestas continuas. Si los datos no son coherentes con una relación concentración-respuesta monótona, deben utilizarse las pruebas de Dunnett o de Dunn (tras una transformación adecuada de los datos, si es necesario).
55. En cuanto a la fecundidad, se efectúan diariamente recuentos de los huevos, pero pueden analizarse como recuento de los huevos totales o como medición repetida. En el apéndice 10 se presentan los detalles de cómo se analiza este parámetro. Con respecto a los datos de histopatología en forma de puntuaciones de intensidad, se ha desarrollado una nueva prueba estadística, la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS) (33).
56. Deberán indicarse todos los parámetros observados en los tratamientos con el producto que sean significativamente diferentes de los de los testigos adecuados.

Consideraciones relativas al análisis de los datos

Uso de niveles de tratamiento alterados

57. Hay varios factores que se tienen en cuenta a la hora de determinar si una réplica o un tratamiento entero muestran toxicidad manifiesta y deben eliminarse del análisis. La toxicidad manifiesta se define como una mortalidad > 4 muertes en cualquier réplica entre 3 stf y 9 stf que no se puedan explicar por un error técnico. Entre otros signos de toxicidad manifiesta se incluyen hemorragia, comportamientos anómalos, forma anómala de nadar, anorexia y cualquier otro signo clínico de enfermedad. En lo que respecta a los signos de toxicidad subletales, es posible que sea necesario realizar evaluaciones cualitativas, que siempre deben hacerse en relación con el grupo testigo del agua de dilución (solo agua

limpia). Si es evidente que hay toxicidad manifiesta en el tratamiento o tratamientos más altos, se recomienda proceder a la censura estadística de dichos tratamientos en el análisis.

Controles del disolvente

58. El uso de un disolvente solo debe plantearse como último recurso, una vez consideradas todas las demás opciones de distribución del producto. Si se utiliza un disolvente, debe haber conjuntamente un testigo del agua de dilución. Al finalizar el ensayo, debe efectuarse una evaluación de los efectos potenciales del disolvente. Esto se realiza mediante una comparación estadística del grupo control del disolvente y del grupo testigo del agua de dilución. Los parámetros más pertinentes que deben tenerse en cuenta en este análisis son los factores determinantes del crecimiento (peso), ya que pueden verse afectados por una toxicidad generalizada. Si se detectan diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre el grupo testigo del agua de dilución y el grupo control del disolvente, debe aplicarse el mejor juicio profesional para determinar si está afectada la validez del ensayo. Si los dos grupos difieren, deben compararse con el control del disolvente los tratamientos expuestos al producto, a menos que se sepa que es preferible la comparación con el testigo del agua de dilución. Si no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, se recomienda comparar los tratamientos expuestos al producto problema con los grupos reunidos (grupo control del disolvente y grupo testigo del agua de dilución), a menos que se sepa que es preferible la comparación solo con el grupo testigo del agua de dilución o con el grupo control del disolvente.

Informe del ensayo

59. El informe del ensayo debe incluir lo siguiente:

Producto problema: naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;

- Datos de identificación química.

Sustancias de un solo componente:

- aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, como nombres IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

- caracterizadas 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.

Especie de ensayo:

- Nombre científico, cepa si se conoce, fuente y método de recogida de los huevos fertilizados y manipulaciones posteriores.

Condiciones del ensayo:

- Fotoperíodo o fotoperíodos;
- Diseño del ensayo (por ejemplo, tamaño, material y volumen de agua de la cámara, número de cámaras de ensayo y de réplicas, número de animales eclosionados por réplica);
- Método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificará el agente solubilizante empleado y su concentración);
- Método de administración del producto problema (p. ej., bombas, sistemas de dilución);
- Eficiencia de recuperación del método y concentraciones nominales de ensayo, límite de detección, medias de los valores medidos en los recipientes de ensayo y sus desviaciones típicas, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones del producto problema en disolución verdadera;
- Características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión (si se ha medido), salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;
- Concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas;
- Calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, temperatura (diaria) y concentración de oxígeno disuelto;
- Información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

Resultados:

- Prueba de que los testigos cumplen los criterios generales de validación;
- Datos de los grupos testigo (más control del disolvente cuando se utilice) y de tratamiento como se indica a continuación, eclosión (capacidad de eclosión y tiempo hasta esta) de F1 y F2, supervivencia tras la eclosión de F1, crecimiento (longitud y peso corporal) de F1, sexo genotípico y diferenciación sexual (por ejemplo, caracteres sexuales secundarios sobre la base de las papilas de la aleta anal y de la histología de las gónadas) de F1, sexo fenotípico de F1, caracteres sexuales secundarios (papilas de la aleta anal) de F1, ARNm

vtg (o proteína VTG) de F1, evaluación histopatológica (gónadas, hígado y riñones) de F1 y reproducción (fecundidad y fertilidad) de F0 y F1 (véanse los cuadros 1 y 2);

- Enfoque del análisis (análisis de regresión o análisis de la varianza) y tratamiento estadístico de los datos (pruebas y modelos estadísticos utilizados);
- Concentración sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada;
- Concentración mínima con efecto observado (LOEC) para cada respuesta evaluada (con $p = 0,05$); CE_x para cada respuesta evaluada, si procede, e intervalos de confianza (p. ej., del 90 % o del 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva de concentración-respuesta, la fórmula del modelo de regresión, los parámetros estimados del modelo y sus errores típicos;
- Eventuales desviaciones de este método de ensayo y de los criterios de aceptación, así como consideración de sus posibles consecuencias sobre el resultado del ensayo.

60. En cuanto a los resultados de las mediciones de los parámetros, deben presentarse los valores medios y sus desviaciones típicas (tanto en relación con las réplicas como en relación con las concentraciones, si es posible).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2012 a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponible en: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 23), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Capítulo C.15 del presente anexo, Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines.

- (21) Capítulo C.37 del presente anexo, Ensayo de veintiún días en peces: cribado a corto plazo de la actividad estrogénica y androgénica y de la inhibición de la aromatasa.
- (22) Capítulo C.41 del presente anexo, Ensayo de desarrollo sexual en peces.
- (23) Capítulo C.48 del presente anexo, Ensayo de reproducción de peces a corto plazo.
- (24) Capítulo C.47 del presente anexo, Ensayo de toxicidad en las primeras fases de vida de los peces.
- (25) Capítulo C.49 del presente anexo, Ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), Publicaciones de la OCDE, París.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Producto: Sustancia o mezcla.

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción.

Fecundidad: Número de huevos.

Fertilidad: Número de huevos viables / fecundidad.

Longitud furcal (FL, *fork length*): Longitud desde la punta del hocico hasta la escotadura de la aleta caudal. Se utiliza en peces en los que es difícil apreciar dónde termina la columna vertebral (www.fishbase.org).

Capacidad de eclosión: Número de animales eclosionados / número de embriones cargados en una incubadora.

IACUC: Comité de Utilización y Cuidado de Animales en Instituciones (Institutional Animal Care and Use Committee).

Longitud estándar (SL, *standard length*): Longitud de un pez medida desde la punta del hocico hasta el extremo posterior de la última vértebra o hasta el extremo posterior de la parte mediolateral de la placa hipural. Básicamente, en esta medida se excluye la aleta caudal (www.fishbase.org).

Longitud total (TL, *total length*): Longitud desde la punta del hocico hasta la punta del lóbulo más largo de la aleta caudal, normalmente medida con los lóbulos comprimidos a lo largo de la línea media. Se mide en línea recta, y no siguiendo la curvatura del cuerpo (www.fishbase.org).

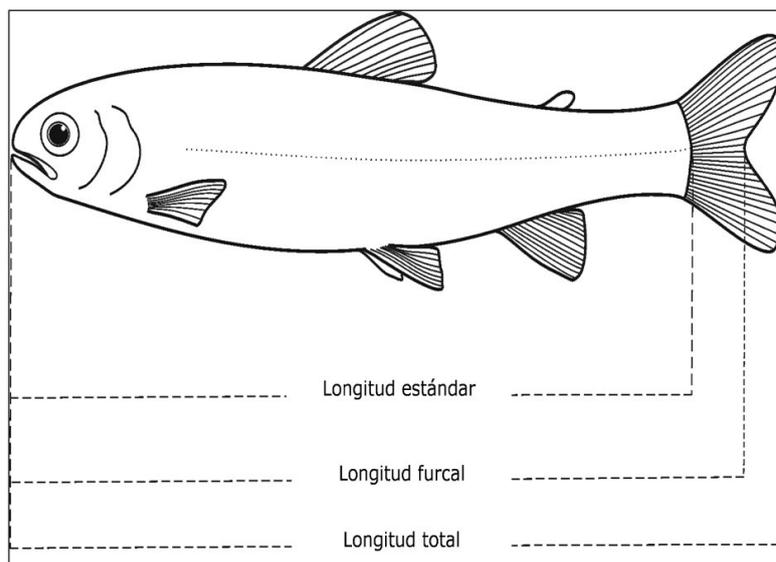


Figura 1: Descripción de las diferentes longitudes utilizadas.

CE_x: Concentración con efecto del x %; es la concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un testigo. Por ejemplo, una CE₅₀ es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

Ensayo dinámico: Ensayo con un flujo continuo de soluciones de ensayo por el sistema de ensayo durante la duración de la exposición.

Eje HPG: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*hypothalamic-pituitary-gonadal*).

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Tasa de carga: Peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): Concentración más baja de producto problema con la que se observa un efecto estadístico significativo (con $p < 0,05$) en comparación con el testigo. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC). En los apéndices 5 y 6 se recogen las orientaciones pertinentes.

Concentración letal mediana (CL₅₀): Concentración de un producto problema de la que se estima que mata al 50 % de los organismos de ensayo durante la duración del ensayo.

Concentración sin efecto observado (NOEC): Concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto

estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

SMILES: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Densidad de población: Número de peces por unidad de volumen de agua.

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.

VTG: La vitelogenina es una fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

STF: Semanas tras la fertilización.

Apéndice 2**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA**

Sustancia	Límite de concentración
Partículas	5 mg/l
Carbono orgánico total	2 mg/l
Amoníaco no ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgánico total	25 ng/l
Aluminio	1 µg/l
Arsénico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Hierro	1 µg/l
Plomo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Cinc	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Plata	100 ng/l

Apéndice 3**CONDICIONES DE ENSAYO DEL MEOGRT**

1. Especie recomendada	Medaka japonés (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Tipo de ensayo	Dinámico continuo
3. Temperatura del agua	La temperatura nominal de ensayo es de 25 °C. La temperatura media a lo largo del ensayo en cada recipiente es de 24-26 °C.
4. Calidad de la iluminación	Bombillas fluorescentes (amplio espectro y ~ 150 lúmenes/m ²) (~ 150 lux). 16 h de luz, 8 h de oscuridad
6. Tasa de carga	F0: 2 adultos/réplica; F1: se inicia con un máximo de 20 huevos (embriones)/réplica, se reduce a 12 embriones/réplica en la eclosión, después a 2 adultos (pareja de cría XX-XY) a las 9-10 stf para la fase de reproducción
7. Volumen mínimo utilizable de la cámara de ensayo	1,8 l (por ejemplo, tamaño de la cámara de ensayo: 18 x 9 x 15 cm)
8. Intercambios de volumen de las soluciones de ensayo	Desde un mínimo de 5 renovaciones de volumen / día hasta 16 renovaciones de volumen / día de volumen (o flujo de 20 ml/minuto)
9. Edad de los organismos de ensayo en el momento del inicio	F0: > 12 stf pero se recomienda no superar 16 stf
10. Número de organismos por réplica	F0: 2 peces (pareja de macho y hembra); F1: Máximo 20 peces (huevos) / réplica (producidos a partir de parejas de cría F0 y F1).
11. Número de tratamientos	5 tratamientos con el producto problema más el testigo o testigos adecuados
12. Número de réplicas por tratamiento	Mínimo de 6 réplicas por tratamiento con producto problema y mínimo de 12 réplicas del testigo, y del control del disolvente, si se utiliza (el número de réplicas se duplica dentro de la fase de reproducción en F1).
13. Número de organismos por ensayo	Mínimo de 84 peces en F0 y 504 en F1. (Si se utiliza el control del disolvente, entonces 108 peces en F0 y 648 peces en F1). La unidad contabilizada es el animal que ha pasado la fase de embrión libre.
14. Régimen de alimentación	Los peces se alimentan con nauplios de 24 h de edad de artemia salina (<i>Artemia</i> spp.) <i>ad libitum</i> , complementados en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio (véase en el apéndice 5 un ejemplo de programa de alimentación para garantizar un crecimiento y

desarrollo adecuados que permitan una sólida reproducción).

15. Aireación Ninguna, a menos que la proporción de oxígeno disuelto se acerque a valores < 60 % del valor de saturación del aire
16. Agua de dilución Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada
17. Período de exposición En principio 19 semanas (de F0 a la eclosión de F2)
18. Parámetros biológicos (primarios) Capacidad de eclosión (F1 y F2); supervivencia [F1, desde la eclosión hasta 4 stf (final de la fase de larva / comienzo de la fase de juvenil), de 4 a 9 (o 10) stf (del comienzo de la fase de juvenil a la de subadulto) y de 9 a 15 stf (de subadulto a la finalización como adulto)]; crecimiento (F1, longitud y peso a 9 y 15 stf); características sexuales secundarias (F1, papilas de la aleta anal a 9 y 15 stf); vitelogenina (F1, ARNm *vtg* o proteína VTG a 15 stf); sexo fenotípico (F1, por medio de la histología de las gónadas a 15 stf); reproducción (F0 y F1, fecundidad y fertilidad durante 21 días); tiempo hasta desovar (F1); e histopatología (F1, gónadas, hígado y riñón a 15 stf)
19. Criterios de validez del ensayo Oxígeno disuelto > 60 % del valor de saturación del aire; temperatura media del agua de 24-26 °C durante todo el ensayo; reproducción con éxito de > 65 % de las hembras del testigo o testigos; fecundidad media diaria de > 20 huevos en el testigo o testigos; capacidad de eclosión \geq 80 % (media) en los testigos (en cada generación F1 y F2); supervivencia después de la eclosión hasta las 3 stf de \geq 80 % (media) y desde las 3 stf hasta la terminación en cuanto a la generación \geq 90 % (media) en los testigos (F1), las concentraciones del producto problema en la solución deben mantenerse de forma satisfactoria dentro del intervalo de \pm 20 % de la media de los valores medidos.

Apéndice 4

ORIENTACIONES SOBRE LOS VALORES TÍPICOS DE LOS TESTIGOS

Cabe señalar que estos valores de los testigos se basan en un número limitado de estudios de validación y pueden ser objeto de modificaciones a la luz de la experiencia que se vaya adquiriendo.

Crecimiento

Se miden el peso y la longitud de todos los peces muestreados a las 9 (o 10) y 15 semanas tras la fertilización (stf). Si se sigue este protocolo, se espera obtener a las 9 stf un peso húmedo de 85-145 mg en el caso de los machos y de 95-150 mg en el de las hembras. Los pesos previstos a las 15 stf son de 250-330 mg en el caso de los machos y de 280-350 mg en el de las hembras. Si bien pueden producirse desviaciones importantes de estos intervalos en los distintos peces, unos pesos medios de los testigos fuera de estos intervalos, especialmente por debajo, sugerirían problemas relacionados con la alimentación, el control de la temperatura, la calidad del agua, las enfermedades o cualquier combinación de estos factores.

Eclosión

En general, el éxito de la eclosión en los testigos se sitúa en torno al 90 %; sin embargo, no es infrecuente encontrar valores tan bajos como el 80 %. Un éxito de la eclosión inferior al 75 % puede indicar una agitación insuficiente de los huevos en desarrollo o una atención insuficiente a la hora de manipular los huevos, como por ejemplo cuando no se retiran a tiempo los huevos muertos, lo que provoca una infestación fúngica.

Supervivencia

Las tasas de supervivencia hasta las 3 stf desde la eclosión y después de las 3 stf suelen ser del 90 % o más en los testigos, pero no son alarmantes unas tasas de supervivencia en las fases iniciales de la vida tan bajas como el 80 % en los testigos. El encontrar en los testigos unas tasas de supervivencia inferiores al 80 % sería motivo de preocupación y podría indicar una limpieza insuficiente de los acuarios, pérdida de larvas de peces por enfermedad o por asfixia debida a los bajos niveles de oxígeno disuelto. La mortalidad también puede producirse como resultado de lesiones producidas durante la limpieza del recipiente y por la pérdida de larvas de peces por el desagüe del recipiente.

Gen de la vitelogenina

Si bien los niveles absolutos del gen de la *vitelogenina* (*vtg*), expresados como número de copias/ng de ARNm total, pueden variar considerablemente entre los laboratorios debido a los procedimientos o al instrumental utilizados, la proporción de *vtg* de las hembras testigo debe ser aproximadamente 200 veces superior a la de los machos testigo. No es infrecuente que esta proporción llegue a estar entre 1 000 y 2 000 veces; sin embargo, las proporciones

de menos de 200 veces son sospechosas y pueden indicar problemas con la contaminación de la muestra o problemas con el procedimiento o los reactivos utilizados.

Características sexuales secundarias

En el caso de los machos, el intervalo normal de los caracteres sexuales secundarios, definidos como el número total de segmentos de los radios de la aleta anal que tienen papilas, es de 40-80 segmentos a las 9-10 stf. Para las 15 stf, el intervalo de los machos testigo debe ser de aproximadamente 80-120, y de 0 en el caso de las hembras testigo. Por razones desconocidas, en raras ocasiones algunos machos no tienen papilas presentes a las 9 stf pero, dado que todos los machos testigo tienen papilas a las 15 stf, lo más probable es que esto se deba a un retraso en el desarrollo. La presencia de papilas en las hembras testigo indica la presencia de machos XX en la población.

Machos XX

La incidencia de machos XX en el cultivo resulta ser de aproximadamente un 4 % o menos a 25 °C, con una incidencia que aumenta al aumentar la temperatura. Deben tomarse medidas para reducir al mínimo la proporción de machos XX en la población. Puesto que resulta que la incidencia de machos XX tiene un componente genético y, por tanto, es hereditaria, vigilar la población del cultivo y velar por que no se utilicen machos XX para propagar dicha población es un medio eficaz para reducir la incidencia de machos XX en la población.

Actividad de desove

La actividad de desove en las réplicas testigo debe ser objeto de seguimiento diario antes de realizar la evaluación de la fecundidad. Las parejas testigo pueden evaluarse visualmente de forma cualitativa para comprobar la existencia de la actividad de desove. Para las 12-14 stf, la mayoría de las parejas testigo deben estar desovando. Un bajo número de parejas desovando en este momento indicaría posibles problemas relacionados con la salud, la madurez o el bienestar de los peces.

Fecundidad

Los medakas con buena salud y buena alimentación suelen desovar diariamente a las 12-14 stf, poniendo entre 15 y 50 huevos al día. La producción de huevos de 16 de las 24 parejas de cría testigo recomendadas (> 65 %) debe ser de más de 20 huevos por pareja y día, y puede llegar a unos 40 huevos al día. Si la producción es inferior a esta cantidad, puede ser un signo de que las parejas de desove son inmaduras, están desnutridas o no tienen buena salud.

Fertilidad

La proporción de huevos fértiles de las parejas de desove testigo se encuentra normalmente en la zona del 90 %, no siendo raro encontrar valores en la parte media y superior de la

banda del 90-100 %. Las tasas de fertilidad inferiores al 80 % de los huevos testigo son sospechosas y pueden indicar que se trata de individuos poco sanos o que las condiciones de cultivo no son ideales.

Apéndice 5

EJEMPLO DE PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN

En el cuadro 1 se muestra un ejemplo de programa de alimentación para garantizar un crecimiento y desarrollo adecuados que permitan una sólida reproducción. Puede aceptarse que haya desviaciones de este programa de alimentación, pero en tales casos se recomienda comprobar que se han observado un crecimiento y una reproducción aceptables. Con el fin de seguir el programa de alimentación propuesto, antes de comenzar el ensayo debe determinarse el peso seco de artemia salina por volumen de suspensión de artemia salina. Para ello, se puede pesar un volumen definido de suspensión de artemia salina que se haya secado durante 24 horas a 60 °C en recipientes previamente pesados. Para tener en cuenta el peso de las sales en la suspensión, un mismo volumen de la solución salina utilizada en la suspensión debe también secarse, pesarse y restarse del peso de la suspensión de artemia salina secada. Como alternativa, la artemia salina puede filtrarse y enjuagarse con agua destilada antes de secarse, eliminando así la necesidad de medir el peso de un “blanco de sal”. Esta información se utiliza para poder pasar la información contenida en el cuadro de peso seco de artemia salina a volumen de suspensión de artemia salina que debe darse como alimento por pez. Además, se recomienda pesar semanalmente partes alícuotas de la suspensión de artemia salina para comprobar que es correcto el peso seco de artemia salina que se da como alimento.

Cuadro 1: Ejemplo de programa de alimentación

Tiempo (tras la eclosión)	Artemia salina (mg de peso seco / pez / día)
Día 1	0,5
Día 2	0,5
Día 3	0,6
Día 4	0,7
Día 5	0,8
Día 6	1,0
Día 7	1,3
Día 8	1,7
Día 9	2,2
Día 10	2,8
Día 11	3,5
Día 12	4,2
Día 13	4,5
Día 14	4,8
Día 15	5,2
Días 16-21	5,6
Semana 4	7,7
Semana 5	9,0
Semana 6	11,0
Semana 7	13,5
Semana 8 - sacrificio	22,5

Apéndice 6

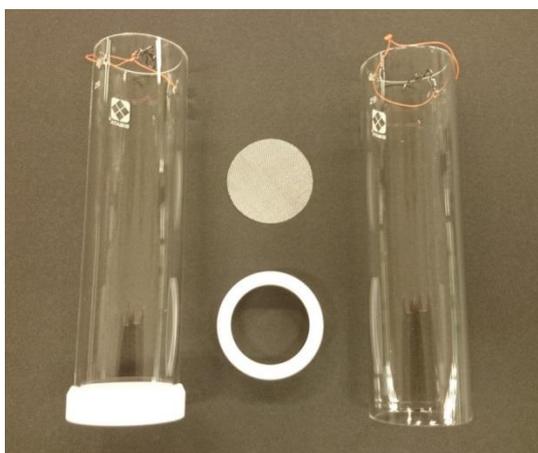
EJEMPLOS DE CÁMARAS DE INCUBACIÓN DE HUEVOS

Ejemplo A



Esta incubadora consiste en un tubo de centrifuga de cristal cortado transversalmente, conectado mediante un manguito de acero inoxidable y mantenido en su sitio por el tapón superior de rosca de la centrifuga. Un pequeño tubo de vidrio o acero inoxidable pasa a través del tapón y se coloca cerca del fondo redondeado, burbujeando aire suavemente para suspender los huevos y reducir la transmisión entre huevos de infecciones por hongos saprófitos, así como facilitar el intercambio químico entre la incubadora y el recipiente de mantenimiento.

Ejemplo B



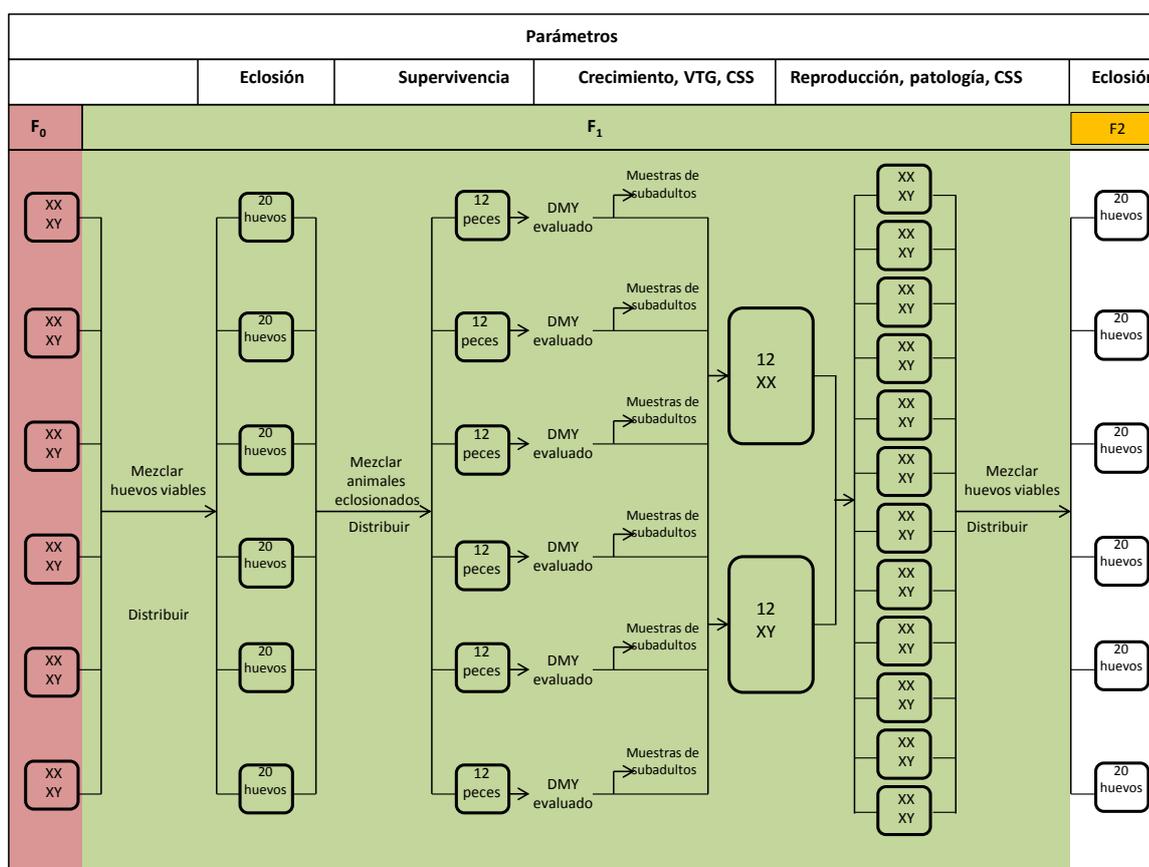


Esta incubadora consta de un cuerpo cilíndrico de vidrio (de 5 cm de diámetro y 10 cm de altura) y de malla de alambre inoxidable (0,25 ϕ y 32 mallas) que está fijada a la parte inferior del cuerpo con un anillo de PTFE. Se suspenden las incubadoras de la barra de elevación en los recipientes y se agitan verticalmente (aproximadamente 5 cm de amplitud) en un ciclo adecuado (aproximadamente una vez cada 4 segundos) en el caso de los huevos de medaka.

Apéndice 7

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO PARA MEZCLAR Y POBLAR LAS RÉPLICAS EN EL MÉTODO DE ENSAYO MEOGRT

Figura 1: Mezcla y repoblación de las réplicas en el MEOGRT. La figura representa un tratamiento o la mitad de un testigo. Debido a la mezcla, la identidad de las réplicas no se mantiene continuamente durante todo el ensayo. Téngase en cuenta que el término «huevos» se refiere a huevos fertilizados viables (equivalentes a embriones).



cada uno en un conjunto completo de réplicas en todos los puntos del calendario del MEOGRT. Durante el desarrollo del organismo de ensayo en la generación F1 (y en la F2, hasta la eclosión), esta estructura de las réplicas sigue siendo la misma. Sin embargo, en la fase adulta, cuando se configuran las parejas de cría F1, lo mejor es duplicar el número de réplicas de parejas de cría por tratamiento; por lo tanto, hay hasta doce parejas replicadas en cada tratamiento con producto problema y veinticuatro parejas replicadas en el grupo testigo (y otras veinticuatro parejas replicadas en el control del disolvente, en caso necesario). La determinación de la eclosión de los embriones puestos por las parejas F1 se hace con la misma estructura de réplicas que con los embriones puestos por las parejas F0, lo que significa inicialmente seis réplicas por tratamiento con producto problema y doce réplicas en el grupo o grupos testigo.

Apéndice 8

RECUESTO DE LAS PAPILAS DE LA ALETA ANAL

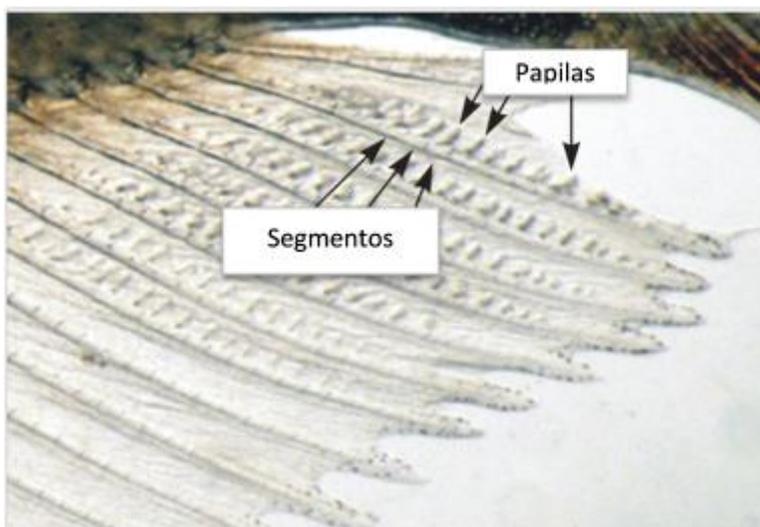
Materiales y reactivos principales

- Microscopía de disección (con cámara opcional adjunta)
- Fijador (por ejemplo, el de Davidson; no se recomienda el de Bouin), si no se hace el recuento a partir de la imagen.

Procedimientos

Tras la autopsia, se toman imágenes de la aleta anal para permitir el adecuado recuento de las papilas de la aleta anal. Aunque la toma de imágenes es el método recomendado, puede fijarse la aleta anal con fijador de Davidson, o con otro fijador adecuado, durante aproximadamente un minuto. Es importante mantener plana la aleta anal durante la fijación para facilitar el recuento de las papilas. El cuerpo con la aleta anal puede conservarse en fijador de Davidson u otro fijador adecuado hasta que se analice. Se recuenta el número de segmentos (véase la figura 1) con papilas que sobresalen del margen posterior del segmento.

Figura 1: Papilas de la aleta anal



Apéndice 9

CALENDARIO DETALLADO DEL MEOGRT

Semanas de ensayo 1-3 (F0)

Los peces de desove de la generación F0 que cumplen los criterios de selección (véanse los puntos 16-20) se exponen durante tres semanas para permitir que los gametos en desarrollo y los tejidos de las gónadas se expongan al producto problema. Cada uno de los recipientes replicados alberga una sola pareja de peces de cría (pareja de cría con hembra XX y macho XY). Se recogen y recuentan los huevos desovados y se evalúa su fertilidad durante 21 días consecutivos, empezando en el día de ensayo 1.

Semana de ensayo 4 (F0 y F1)

Es preferible que los huevos fertilizados y viables (embriones) se recojan en un solo día; no obstante, si no hay suficientes embriones, podrán recogerse durante dos días. Si se recogen a lo largo de dos días, todos los embriones incluidos dentro de los tratamientos que se hayan obtenido el primer día se agrupan con los recogidos el segundo día. A continuación, el total de embriones agrupados de cada tratamiento se distribuye aleatoriamente por cada una de las incubadoras replicadas en la proporción de 20 embriones por incubadora. La mortalidad de los huevos fertilizados (embriones) se comprueba y registra diariamente. Los huevos muertos se retiran de las incubadoras (la muerte en los huevos fertilizados puede observarse, sobre todo en las primeras fases, por una acusada pérdida de translucidez y un cambio de la coloración, debido a la coagulación o la precipitación de las proteínas, que conducen a un aspecto blanco opaco; OCDE, 2010).

Nota: Si alguno de los tratamientos necesita un segundo día de recogida, aunque sea uno solo, todos los tratamientos (incluidos los testigos) deberán seguir este procedimiento. Si, después del segundo día de recogida, no se dispone de un número suficiente de embriones dentro de un tratamiento para la carga de 20 embriones por incubadora, se reduce el número de embriones cargados dentro de ese tratamiento específico a 15 embriones por incubadora. Si no hay suficientes embriones para cargar 15 por incubadora, se reduce el número de incubadoras replicadas hasta que haya suficientes embriones para poner 15 por incubadora. Además, podrían añadirse más parejas de cría por tratamiento y testigo en F0 para producir más huevos, a fin de alcanzar la cifra recomendada de 20 por réplica.

En el día de ensayo 24, las parejas de cría de la F0 se sacrifican de forma compasiva y se registran el peso y la talla. Si es necesario, pueden conservarse parejas de cría de la F0 durante un período adicional de 1-2 días para reiniciar F1.

Semanas de ensayo 5-6 (F1)

Uno o dos días antes del inicio previsto de la eclosión, se detiene o reduce la agitación de los huevos en incubación para acelerar la eclosión. Según van eclosionando los embriones cada día, se agrupan por tratamiento y se distribuyen sistemáticamente por cada uno de los

recipientes replicados de larvas dentro de un tratamiento específico con un máximo de doce animales eclosionados. Para ello se seleccionan aleatoriamente los animales eclosionados y se coloca uno solo de ellos en las sucesivas réplicas de forma indiscriminada, siguiendo un orden a lo largo de las réplicas del tratamiento específico, hasta que todas las réplicas dentro del tratamiento tengan doce animales eclosionados. Si no hay suficientes animales para completar todas las réplicas, ha de asegurarse que el mayor número posible de réplicas tiene doce animales para iniciar la fase F1.

Los huevos que no hayan eclosionado en un período del doble del día mediano de eclosión del testigo se consideran inviables y se desechan. Se registra el número de animales eclosionados y se calcula el éxito de la eclosión (capacidad de eclosión) en cada réplica.

Semanas de ensayo 7-11 (F1)

Se comprueba y registra diariamente la supervivencia de las larvas en todas las réplicas. En el día de ensayo 43, se registra el número de peces supervivientes en cada réplica y el número inicial de animales eclosionados puestos en la réplica (en principio, doce). Esto permite calcular el porcentaje de supervivencia desde la eclosión hasta la fase de subadulto.

Semanas de ensayo (F1)

En el día de ensayo 78-85, se toma una pequeña muestra de la aleta caudal (es decir, se recorta un trozo de la aleta) de cada pez para determinar el sexo genotípico del individuo de todos los peces. Esta información se utiliza para establecer las parejas de cría.

Dentro de los tres días siguientes a la determinación del sexo genotípico de cada pez, se establecen doce parejas de cría por tratamiento y veinticuatro parejas por cada testigo. Se seleccionan al azar dos peces XX y XY de cada réplica y se agrupan por sexo y, a continuación, se seleccionan aleatoriamente para establecer una pareja de cría (es decir, una pareja XX-XY). Se establece un mínimo de doce réplicas por tratamiento con producto y un mínimo de veinticuatro réplicas por testigo con una pareja de cría por réplica. Si una réplica no tiene dos peces XX o dos peces XY para la agrupación, deben obtenerse peces con el genotipo sexual adecuado a partir de otras réplicas dentro del tratamiento.

El resto de los peces (máximo de ocho peces por réplica) se sacrifican de forma compasiva y se toman muestras en relación con los distintos parámetros de los subadultos. Se conservan los datos *dmy* (XX o XY) de todas las muestras de subadultos a fin de garantizar que todos los datos de los parámetros pueden relacionarse con el sexo genético de cada pez.

Semanas de ensayo 13-14 (F1)

La exposición continúa mientras las parejas de cría subadultas se van convirtiendo en adultas. En el día de ensayo 98 (es decir, el día anterior al inicio de la recogida de los huevos), se retiran los huevos tanto de los acuarios como de las hembras.

Semanas de ensayo 15-17 (F1)

Se recogen diariamente los huevos desovados durante veintidós días consecutivos en cada réplica, y se evalúan la fecundidad y la fertilidad.

Semana de ensayo 18 (repetición de la semana de ensayo 4) (F1 y F2)

En el día de ensayo 120, se recogen los huevos de cada recipiente de las réplicas por la mañana. Se evalúan los huevos recogidos, y los huevos fertilizados (con los filamentos eliminados) de cada una de las parejas de cría se agrupan por tratamiento y se distribuyen sistemáticamente por las cámaras de incubación de huevos en la proporción de veinte huevos fertilizados por incubadora. Las incubadoras pueden colocarse en "recipientes de incubación" separados que se establezcan para cada tratamiento o en el recipiente de la réplica que contendrá los animales tras la eclosión. Es preferible que los embriones se recojan en un solo día; no obstante, si no hay suficiente embriones, podrán recogerse durante dos días. Si se recogen a lo largo de dos días, todos los embriones dentro de los tratamientos que se hayan obtenido el primer día se agrupan con los recogidos el segundo día. A continuación, el total de embriones agrupados de cada tratamiento se distribuye aleatoriamente por cada una de las incubadoras replicadas en la proporción de veinte embriones por incubadora. Nota: Si alguno de los tratamientos necesita un segundo día de recogida, aunque sea uno solo, todos los tratamientos (incluidos los testigos) deberán seguir este procedimiento. Si, después del segundo día de recogida, no se dispone de un número suficiente de embriones dentro de un tratamiento para la carga de veinte embriones por incubadora, el número de embriones cargados dentro de ese tratamiento específico se reduce a quince embriones por incubadora. Si no hay suficiente embriones para cargar quince por incubadora, se reduce el número de incubadoras replicadas hasta que haya suficientes embriones para poner quince por incubadora.

En el día de ensayo 121 (o en el día de ensayo 122, para garantizar que la generación F2 ha empezado bien), las parejas de cría F1 se sacrifican de forma compasiva y se analizan en relación con los parámetros de adultos. Si es necesario, pueden conservarse parejas de cría F1 durante un período adicional de 1-2 días para reiniciar F2.

Semanas de ensayo 19-20 (F2)

Uno a dos días antes del inicio previsto de la eclosión, se detiene o reduce la agitación de los huevos en incubación para acelerar la eclosión. Si se pone fin al ensayo con la terminación de la eclosión de F2, se registra cada día el número de animales eclosionados, los cuales se desechan. (Se consideran inviables los embriones que no han eclosionado después de un período de incubación prolongado, definido como el doble del día mediano de eclosión del testigo).

Apéndice 10

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tipos de datos biológicos que se generan en el MEOGRT no son específicos de este y, salvo en el caso de los datos de histopatología, se han elaborado muchas metodologías estadísticas apropiadas para analizar adecuadamente datos similares en función de las características de los datos, incluida la normalidad, la homogeneidad de la varianza, si el diseño del estudio se presta a análisis de hipótesis o a análisis de regresión, ensayos paramétricos o no paramétricos, etc. En general, los análisis estadísticos propuestos siguen las recomendaciones de la OCDE para los datos de ecotoxicidad (OCDE 2006) y en la figura 2 se puede ver un diagrama de flujo relativo al análisis de datos del MEOGRT.

Se parte de la base de que, en la mayoría de los casos, los conjuntos de datos van a mostrar respuestas monótonas. Además, debe considerarse la posibilidad de utilizar una prueba estadística unilateral frente a una prueba estadística bilateral. A menos que exista un razonamiento biológico por el que se considere inadecuada una prueba unilateral, se sugiere utilizar estas pruebas unilaterales. Si bien en la siguiente sección se recomiendan determinadas pruebas estadísticas, si se elaboran métodos estadísticos más adecuados o más potentes para su aplicación a los datos específicos generados en el MEOGRT, esas pruebas estadísticas se utilizarían para aprovechar esas ventajas.

Los datos del MEOGRT deben analizarse por separado para cada sexo genotípico. Hay dos estrategias para analizar los datos de peces de sexo invertido (bien machos XX o bien hembras XY): 1) censurar todos los datos de los peces de sexo invertido en la totalidad del ensayo, excepto la prevalencia de la inversión de sexo en cada réplica; 2) dejar en el conjunto de datos los datos de todos los peces de sexo invertido y analizarlos sobre la base del genotipo.

Datos de histopatología

Los datos de histopatología se presentan como puntuaciones de intensidad que se evalúan utilizando un procedimiento estadístico recientemente desarrollado, la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS, *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) (Green *et al.*, 2014). El ajuste de *Rao-Scott* mantiene información sobre la replicación del ensayo; el procedimiento *por cortes* incorpora la expectativa biológica de que las puntuaciones de intensidad tienden a aumentar con el aumento de las concentraciones de tratamiento. Para cada diagnóstico, el resultado del RSCABS especifica qué tratamientos presentan mayor prevalencia de histopatología que los testigos, y su nivel de intensidad asociado.

Datos de la fecundidad

Los análisis de los datos de la fecundidad consisten en una prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra o de Williams para determinar los efectos del tratamiento, siempre que los datos sean compatibles con una relación concentración-respuesta monótona. Con una

prueba de ajuste secuencial, todas las comparaciones se realizan al nivel de significación de 0,05 y no se realiza ningún ajuste por el número de comparaciones realizadas. Se espera que los datos sean compatibles con una relación concentración-respuesta monótona, pero esto puede verificarse, bien mediante la inspección visual de los datos, bien mediante la elaboración de contrastes lineales y cuadráticos de medias de tratamiento tras una transformación ordinal por rangos de los datos. A menos que el contraste cuadrático sea significativo y el contraste lineal no lo sea, se realiza la prueba de tendencia. De lo contrario, se utiliza la prueba de Dunnett para determinar los efectos del tratamiento si los datos se distribuyen normalmente con varianzas homogéneas. Si no se cumplen estos requisitos, se utiliza la prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni-Holm. Todas las pruebas indicadas se realizan con independencia de cualquier prueba global F o Kruskal-Wallis. En la referencia OCDE 2006 se ofrecen más detalles.

Pueden utilizarse métodos alternativos, como un modelo lineal generalizado con errores de Poisson para los recuentos de huevos (sin transformar), si está justificado estadísticamente (Cameron y Trividi, 2013). Si se utiliza un enfoque alternativo, se recomienda asesoramiento estadístico.

Recuento diario de huevos dentro de una sola generación

El modelo ANOVA viene dado por $Y = \text{Tiempo} * \text{Tiempo} + \text{Tratamiento} + * \text{Tratamiento} + \text{Tiempo} * \text{Tratamiento} + * \text{Tiempo} * \text{Tratamiento}$, con efectos aleatorios de Réplica (Generación * Tratamiento) y Tiempo * Réplica (Tratamiento), teniendo en cuenta componentes desiguales de la varianza de ambos tipos entre generaciones. Aquí “Tiempo” hace referencia a la frecuencia de recuento de los huevos (por ejemplo, día o semana). Se trata de un análisis de medidas repetidas, con las correlaciones entre observaciones de las mismas réplicas teniendo en cuenta el carácter de medidas repetidas de los datos.

Los principales efectos del tratamiento se prueban con la prueba de Dunnett (o Dunnett-Hsu) que se ajusta por el número de comparaciones. Es necesario aplicar ajustes por el efecto principal de la generación o el tiempo, ya que respecto a estos dos factores no existe un nivel de “testigo” y cada pareja de niveles es una comparación de posible interés. En el caso de estos dos efectos principales, si la prueba F para el efecto principal es significativa al nivel de 0,05, las comparaciones por parejas entre niveles de ese factor pueden someterse entonces a ensayo al nivel de 0,05 sin más ajuste.

El modelo incluye interacciones de dos y tres factores, de modo que un efecto principal para, por ejemplo, el tiempo, puede no ser significativo, aunque el tiempo tenga un impacto significativo en los resultados. Así, si una interacción de dos o tres factores en la que participa el tiempo es significativa al nivel de 0,05, se pueden aceptar sin más ajuste las comparaciones de niveles de tiempo al nivel de significación de 0,05.

A continuación están las pruebas F relativas a la significación del tratamiento dentro del tiempo, los llamados cortes en el cuadro de ANOVA. Si, por ejemplo, el corte para el tratamiento dentro de F1 y el tiempo 12 es significativo al nivel de 0,05, las comparaciones por parejas para el tratamiento dentro de F1 y el tiempo 12 pueden aceptarse sin más ajuste

al nivel de 0,05. Se aplican declaraciones similares a las pruebas para el tiempo dentro de F1 y el tratamiento, y para la generación dentro del tiempo y el tratamiento.

Por último, en el caso de las comparaciones no incluidas en ninguna de las categorías anteriores, las comparaciones deben ajustarse a los valores p mediante el ajuste de Bonferroni-Holm. Puede encontrarse más información sobre los análisis de estos modelos en Hocking (1985) y Hochberg y Tamhane (1987).

Como alternativa, los datos brutos se registran y se presentan en el informe del estudio como la fecundidad (número de huevos) por réplica para cada día. Debe calcularse la media de las réplicas de los datos en bruto y después hay que aplicar una transformación de raíz cuadrada. Debe calcularse un ANOVA de un factor con las medias de las réplicas transformadas, seguido de contrastes de Dunnett. También puede ser útil inspeccionar visualmente los datos de fecundidad de cada tratamiento y/o réplica con un diagrama de dispersión que muestre los datos a lo largo del tiempo. Esto permitirá una evaluación informal de los efectos potenciales a lo largo del tiempo.

Todos los demás datos biológicos

Los análisis estadísticos se basan en la suposición de que, si la selección de las dosis es adecuada, los datos serán monótonos. Así pues, se supone que los datos son monótonos y su monotonía se evalúa formalmente mediante el uso de contrastes lineales y cuadráticos. Si los datos son monótonos, se recomienda una prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra con las medianas de las réplicas (según lo aconsejado en OCDE 2006). Si el contraste cuadrático es significativo y el contraste lineal no lo es, se considera que los datos son no monótonos.

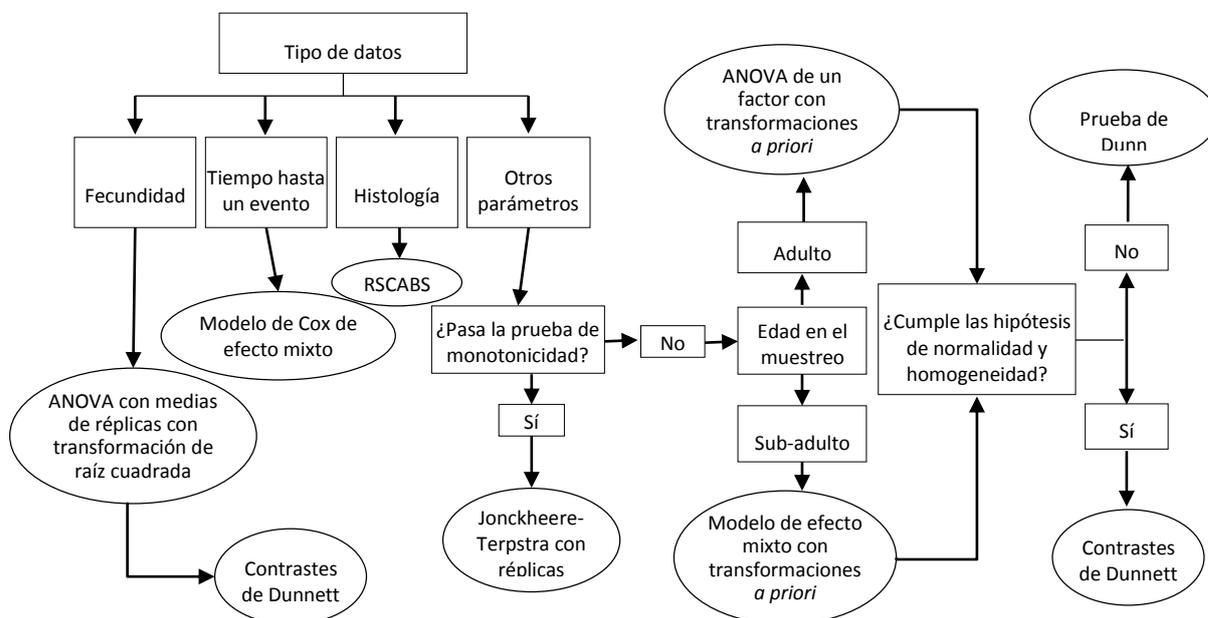
Si los datos son no monótonos, en particular debido a la reducción de la respuesta del tratamiento más elevado o de los dos tratamientos más elevados, debe considerarse la censura del conjunto de datos para que el análisis se lleve a cabo sin dichos tratamientos. Esta decisión deberá adoptarse con juicio profesional y todos los datos disponibles, especialmente los datos que indiquen toxicidad manifiesta a dichos niveles de tratamiento.

Por lo que respecta al peso y la longitud, no se recomiendan transformaciones, aunque ocasionalmente puedan ser necesarias. No obstante, se recomienda una transformación logarítmica para los datos de vitelogenina, una transformación de raíz cuadrada para los datos sobre los CSS (papilas de la aleta anal), y una transformación arcoseno de raíz cuadrada para los datos relativos a la proporción de la eclosión, al porcentaje de supervivencia, a la proporción de sexos y al porcentaje de huevos fértiles. El tiempo hasta la eclosión y el tiempo hasta el primer desove deben tratarse como datos de tiempo hasta un evento, y los distintos embriones que no eclosionan en el plazo definido o las réplicas en las que no hay desove se tratan como datos censurados por la derecha. El tiempo hasta la eclosión debe calcularse a partir del día mediano de eclosión de cada réplica. Estos parámetros deben analizarse utilizando un modelo de peligro proporcional de Cox de efecto mixto.

Los datos biológicos de las muestras de adultos tienen una medición por réplica, es decir, hay un pez XX y un pez XY por cada réplica de acuario. Por lo tanto, se recomienda efectuar un ANOVA de un factor con las medias de las réplicas. Si se cumplen las hipótesis del ANOVA (normalidad y homogeneidad de la varianza evaluadas con los valores residuales del ANOVA mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, respectivamente), deben utilizarse contrastes de Dunnett para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo. Por otra parte, si no se cumplen las hipótesis del ANOVA, debe realizarse una prueba de Dunn para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo. Se recomienda un procedimiento similar para los datos en forma de porcentajes (fertilidad, eclosión y supervivencia).

Los datos biológicos de las muestras de subadultos tienen de 1 a 8 mediciones por réplica, es decir, puede haber números variables de individuos que contribuyen a la media de las réplicas respecto a cada sexo genotípico. Por lo tanto, se recomienda utilizar un modelo de ANOVA de efecto mixto, seguido por contrastes de Dunnett, si se cumplen las hipótesis de normalidad y homogeneidad de la varianza (con los valores residuales del ANOVA de efecto mixto). Si no se cumplen, debe realizarse una prueba de Dunn para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo.

Figura 2: Diagrama de flujo de los procedimientos estadísticos recomendados para el análisis de datos del MEOGRT.



Bibliografía

- (1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), Publicaciones de la OCDE, París.

- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53. ENSAYO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LARVAS DE ANFIBIOS (LAGDA)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 241 de la OCDE (2015). La necesidad de elaborar y validar un ensayo que permita identificar y caracterizar las consecuencias negativas de la exposición a productos tóxicos en los anfibios procede de la preocupación de que los niveles medioambientales de productos puedan tener efectos adversos tanto en los seres humanos como en la vida silvestre. Las directrices de ensayo de la OCDE sobre el ensayo de crecimiento y desarrollo de larvas de anfibios (LAGDA, *Larval Amphibian Growth and Development Assay*) describen un ensayo de toxicidad con una especie anfibia que tiene en cuenta el crecimiento y el desarrollo a partir de la fertilización durante la fase temprana de juveniles. Se trata de un ensayo (normalmente de 16 semanas) que evalúa el desarrollo temprano, la metamorfosis, la supervivencia, el crecimiento y la maduración sexual parcial. También incluye la medición de un conjunto de otros parámetros que permite la evaluación diagnóstica de los productos sospechosos de alterar el sistema endocrino u otros tipos de sustancias tóxicas para el desarrollo y para la reproducción. El método descrito en este método de ensayo procede del trabajo de validación con la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) por parte de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (U.S. EPA) con apoyo de Japón (1). Aunque otras especies anfibias pueden adaptarse a un protocolo de ensayo de crecimiento y desarrollo con la capacidad de determinar el sexo genético como componente importante, los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método de ensayo son aplicables únicamente a *Xenopus laevis*.
2. El LAGDA sirve como prueba de nivel superior con anfibios para recoger información más completa sobre la relación concentración-respuesta en cuanto a los efectos adversos, adecuada para su utilización en la identificación y caracterización de los peligros, así como en la evaluación del riesgo ecológico. El ensayo corresponde al nivel 4 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos, en el que los ensayos *in vivo* también proporcionan datos sobre efectos adversos en relación con parámetros pertinentes endocrinos (2). El diseño experimental general implica exponer embriones de *X. laevis* en la fase 8-10 de Nieuwkoop y Faber (NF) (3) a un mínimo de cuatro concentraciones diferentes de producto problema (por lo general espaciadas a intervalos al menos semilogarítmicos), además del testigo o testigos, hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo, con una submuestra intermedia en la fase NF 62 [\leq 45 días tras la fertilización (dtf); normalmente unos 45 dtf]. Hay cuatro réplicas de cada concentración de ensayo y ocho réplicas del testigo. Los

parámetros evaluados en el transcurso de la exposición (en la submuestra intermedia y en la muestra final al terminar el ensayo) incluyen los que son indicativos de toxicidad generalizada, como mortalidad, comportamiento anormal y determinaciones del crecimiento (longitud y peso), y también parámetros diseñados para caracterizar modos de acción específicos de toxicidad endocrina relacionados con procesos fisiológicos en los que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas. El método hace hincapié principalmente en los posibles efectos pertinentes para la población (en particular, efectos adversos sobre la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento y el desarrollo sexual) a fin de calcular una concentración sin efecto observado (NOEC) o una concentración con efecto del x % en el parámetro medido (cambio en ese porcentaje) (CE_x). Aunque hay que señalar que los enfoques de CE_x rara vez son adecuados para grandes estudios de este tipo, en los que puede ser poco práctico aumentar el número de concentraciones de ensayo para poder determinar la CE_x deseada. También hay que señalar que el método no cubre la fase de reproducción en sí. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Debido al número limitado de productos sometidos a ensayo y de laboratorios implicados en la validación de este ensayo, que es bastante complejo, y en particular a que la reproducibilidad inter-laboratorios no está documentada por ahora con datos experimentales, se prevé que, cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño del estudio, se examinarán las directrices de ensayo 241 de la OCDE y, en caso necesario, se modificarán a la luz de la experiencia adquirida. El LAGDA es un ensayo importante para estudiar los posibles factores del declive de la población de anfibios, al evaluar los efectos de la exposición a los productos durante la fase larvaria sensible, en la que los efectos sobre la supervivencia y el desarrollo, incluido el desarrollo normal de los órganos sexuales, pueden afectar negativamente a la población.
4. El objetivo del ensayo es detectar un efecto o efectos principales resultantes de mecanismos tanto endocrinos como no endocrinos, e incluye parámetros de diagnóstico que son en parte específicos de modalidades endocrinas clave. Hay que señalar que, hasta que se elaboró el LAGDA, no había ningún ensayo validado que sirviera para alcanzar este objetivo con los anfibios.
5. Antes de iniciar el ensayo, es importante disponer de información sobre las propiedades físicoquímicas del producto problema, en particular para permitir la obtención de soluciones estables del producto. También es necesario disponer de un método analítico suficientemente sensible para verificar las concentraciones del producto problema. Con

una duración aproximada de 16 semanas, el ensayo requiere un total de 480 animales, es decir, embriones de *X. laevis*, (o 640 embriones, si se utiliza un control del disolvente) a fin de garantizarle una potencia suficiente para la evaluación de los parámetros pertinentes para la población, como el crecimiento, el desarrollo y la maduración sexual.

6. Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad normativa en cuestión. Además, este ensayo no evalúa directamente la fecundidad, por lo que puede no ser aplicable para su uso en una fase más avanzada que el nivel 4 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

BASE CIENTÍFICA DEL MÉTODO DE ENSAYO

7. Gran parte de nuestra comprensión actual de la biología de los anfibios se ha obtenido utilizando la especie modelo de laboratorio, *X. laevis*. Esta especie puede cultivarse habitualmente en el laboratorio, la ovulación puede inducirse con gonadotropina coriónica humana (hCG) y pueden obtenerse fácilmente poblaciones de animales de los criadores comerciales.
8. Al igual que en todos los vertebrados, la reproducción en los anfibios está controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG, *hypothalamic pituitary gonadal*) (4). Los estrógenos y los andrógenos son mediadores de este sistema endocrino, dirigiendo el desarrollo y la fisiología de tejidos sexualmente dimorfos. Hay tres fases distintas en el ciclo de vida de los anfibios en las que este eje está especialmente activo: 1) la diferenciación de las gónadas durante el desarrollo de las larvas, 2) el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la maduración de las gónadas durante la fase de juveniles, y 3) la reproducción funcional de los adultos. Cada una de estas tres ventanas de desarrollo puede ser susceptible de perturbación endocrina por algunos productos, como los estrógenos y los andrógenos, que, en última instancia, provocaría una pérdida de aptitud para la reproducción por parte de los organismos.
9. Las gónadas comienzan el desarrollo en la fase NF 43, cuando se forma por primera vez la cresta genital bipotencial. La diferenciación de las gónadas comienza en la fase NF 52 cuando las células germinales primordiales bien migran al tejido medular (machos) o bien permanecen en la región cortical (hembras) de las gónadas en desarrollo (3). De este proceso de diferenciación sexual de las gónadas de *Xenopus* se comunicó por primera vez en la década de 1950 que es susceptible de sufrir alteraciones por productos (5) (6). La exposición de los renacuajos al estradiol durante este período de diferenciación de las gónadas conduce a la inversión de sexo de los machos que, cuando llegan a la edad adulta, son hembras plenamente funcionales (7) (8). También es posible la inversión de sexo funcional de las hembras, que se convierten en machos, y se ha informado de ella a raíz de

la implantación de tejido testicular en los renacuajos (9). Sin embargo, aunque la exposición a un inhibidor de la aromatasas también provoca la inversión de sexo funcional en *X. tropicalis* (10), no se ha demostrado que esto ocurra en *X. laevis*. Históricamente, los efectos del producto tóxico sobre la diferenciación de las gónadas se han evaluado mediante el examen histológico de las gónadas en la metamorfosis y la inversión de sexo solo se ha podido determinar mediante el análisis de la proporción de sexos. Hasta hace poco, no había medios para determinar directamente el sexo genético de *Xenopus*. Sin embargo, el reciente establecimiento de marcadores relacionados con el sexo en *X. laevis* hace posible determinar el sexo genético y permite la identificación directa de animales con inversión de sexo (11).

10. En los machos, el desarrollo de los juveniles va de par con un aumento de los niveles sanguíneos de testosterona, lo que provoca el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, así como el de los testículos. En las hembras, los ovarios producen estradiol, lo que da lugar a la aparición de vitelogenina (VTG) en el plasma y de ovocitos vitelogénicos en los ovarios, y al desarrollo de oviductos (12). Los oviductos son caracteres sexuales secundarios femeninos que intervienen en la maduración de los ovocitos durante la reproducción. Se aplican capas de gelatina al exterior de los ovocitos según van pasando por el oviducto y se recogen en el ovisaco, listos para la fertilización. Se ve que el desarrollo del oviducto está regulado por estrógenos, ya que está correlacionado con los niveles sanguíneos de estradiol en *X. laevis* (13) y *X. tropicalis* (12). Se ha comunicado el desarrollo de oviductos en machos tras la exposición a policlorobifenilos (14) y a 4-*terc*-octilfenol (15).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El diseño experimental implica exponer embriones de *X. laevis* en la fase NF 8-10 (3) por la vía del agua a cuatro concentraciones diferentes de producto problema, además del testigo o testigos, hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo, con una submuestra intermedia en la fase NF 62. Aunque también cabe la posibilidad de administrar productos muy hidrófobos por la vía de los alimentos, hasta la fecha ha habido poca experiencia con esa vía de exposición en este ensayo. Hay cuatro réplicas de cada concentración de ensayo y ocho réplicas de cada testigo. Entre los parámetros evaluados en el transcurso de la exposición se incluyen los que indican toxicidad generalizada [es decir, mortalidad, comportamiento anormal y determinaciones del crecimiento (longitud y peso)], así como parámetros diseñados para caracterizar modos de acción específicos de toxicidad endocrina relacionados con procesos fisiológicos en los que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas [es decir, histopatología de la tiroides, histopatología de las gónadas y sus conductos, desarrollo anormal, vitelogenina

plasmática, vitelogenina del plasma (opcional) y proporción de sexos genotípicos/fenotípicos].

CRITERIOS DE VALIDEZ DEL ENSAYO

12. Se aplican los siguientes criterios de validez del ensayo:

- La concentración de oxígeno disuelto ha de ser ≥ 40 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;
- La temperatura del agua debe estar en el intervalo de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la diferencia entre réplicas y entre tratamientos no debe superar el valor de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- El pH de la solución de ensayo debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, y la diferencia entre réplicas y entre tratamientos no debe ser superior a 0,5;
- Debe disponerse de pruebas para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos;
- La mortalidad durante el período de exposición debe ser ≤ 20 % en cada réplica de los testigos;
- La viabilidad ha de ser ≥ 70 % en el desove elegido para iniciar el estudio;
- El tiempo mediano hasta la fase NF 62 de los testigos debe ser ≤ 45 días;
- El peso medio de los organismos de ensayo en la fase NF 62 y al final del ensayo en los testigos y, en su caso, en los controles del disolvente debe alcanzar $1,0 \pm 0,2$ y $11,5 \pm 3$ g, respectivamente.

13. Aunque no es un criterio de validez, se recomienda que se disponga para su análisis de al menos tres niveles de tratamiento con tres réplicas no alteradas. Una mortalidad excesiva, que altere un tratamiento, se define como > 4 muertes (> 20 %) en dos o más réplicas que no se puedan explicar por un error técnico. Debe disponerse para su análisis de al menos tres niveles de tratamiento sin toxicidad manifiesta evidente. Los signos de toxicidad manifiesta pueden incluir, entre otras cosas, flotar en la superficie, tumbarse en el fondo del recipiente, nadar de forma invertida o irregular, dejar de subir a la superficie y no ser sensible a estímulos, o presentar anomalías morfológicas (p. ej., deformidades de las extremidades), lesiones hemorrágicas y edema abdominal.

14. En caso de que se observe una desviación de los criterios de validez del ensayo, se deben tener en cuenta las consecuencias en relación con la fiabilidad de los datos del ensayo y dichas desviaciones y consideraciones deben incluirse en el informe del ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Equipo

15. Se emplea el equipo común de laboratorio y, en particular:

- a) aparatos de ajuste de la temperatura (por ejemplo, calefactores o enfriadores, ajustables a 221 ± 1 °C);
- b) termómetro;
- c) microscopio de disección binocular y herramientas de disección;
- d) cámara digital con un mínimo de 4 megapíxeles de resolución y apta para su uso en microscopía (en caso necesario);
- e) balanza analítica capaz de pesar con precisión de 0,001 mg o 1 µg;
- f) medidor de oxígeno disuelto y pHmetro;
- g) medidor de la intensidad de la luz capaz de medir en unidades lux.

Agua

Fuente y calidad

16. Puede utilizarse cualquier agua de dilución de la que se disponga localmente (p. ej., agua de manantial o agua del grifo pasada por filtro de carbón) y que permita el crecimiento y el desarrollo normales de *X. laevis*; debe disponerse de pruebas de crecimiento normal en esta agua. Como la calidad del agua local puede variar considerablemente de una zona a otra, debe analizarse, en particular si no se dispone de datos históricos sobre la adecuación del agua para criar larvas de anfibios. Antes de iniciar el ensayo y/o, por ejemplo, cada seis meses cuando se sepa que el agua de dilución es de calidad relativamente constante, se debe proceder a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de los aniones y cationes principales (p. ej., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), plaguicidas, carbono orgánico total y sólidos en suspensión. En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

Concentración de yoduro en el agua del ensayo

17. Con el fin de que la glándula tiroidea sintetice las hormonas tiroideas que permiten la metamorfosis normal, es necesario que las larvas tengan acceso a suficiente yoduro mediante una combinación de fuentes acuosas y dietéticas. En la actualidad no existen directrices basadas en datos empíricos sobre concentraciones mínimas de yoduro en los alimentos o en el agua para garantizar un desarrollo adecuado. No obstante, la disponibilidad de yoduro puede afectar a la capacidad de respuesta del sistema tiroideo ante los agentes con actividad tiroidea, y se sabe que modula la actividad basal de la glándula tiroidea, aspecto que merece atención a la hora de interpretar los resultados

histopatológicos de la glándula. Según trabajos previos, se ha visto que el comportamiento del ensayo es adecuado cuando las concentraciones de yoduro (I^-) en el agua de dilución varían entre 0,5 y 10 $\mu\text{g/l}$. Lo ideal es que la concentración mínima de yoduro en el agua de dilución a lo largo de todo el ensayo sea de 0,5 $\mu\text{g/l}$ (añadido como sal de sodio o de potasio). Si el agua del ensayo se ha reconstituido a partir de agua desionizada, debe añadirse yodo a una concentración mínima de 0,5 $\mu\text{g/l}$. Deben indicarse las concentraciones medidas de yoduro del agua del ensayo (es decir, del agua de dilución) y el complemento de yodo u otras sales (en su caso) añadido al agua del ensayo. El contenido de yodo puede medirse también en los alimentos, además de en el agua del ensayo.

Sistema de exposición

18. El ensayo se ha desarrollado con un sistema de diluyente dinámico. Los componentes del sistema que estén en contacto con el agua deben estar hechos de vidrio, acero inoxidable u otros materiales químicamente inertes. Los recipientes de exposición deben ser acuarios de vidrio o de acero inoxidable, y su volumen utilizable debe estar entre 4,0 y 10,0 l (con una profundidad mínima del agua de 10 a 15 cm). El sistema debe ser capaz de soportar todas las concentraciones de exposición, un testigo y un control del disolvente, en caso necesario, con cuatro réplicas por tratamiento y ocho en el caso de los testigos. El caudal de cada recipiente debe ser constante, teniendo en cuenta tanto el mantenimiento de las condiciones biológicas como la exposición al producto. Se recomienda que los caudales sean adecuados (por ejemplo, al menos cinco renovaciones del volumen del recipiente por día) para evitar un descenso de la concentración del producto por el metabolismo tanto de los organismos de ensayo como de los microorganismos acuáticos presentes en los acuarios o por vías abióticas de degradación (hidrólisis, fotólisis) o disipación (volatilización, sorción). A los recipientes de tratamiento se les debe asignar aleatoriamente una posición en el sistema de exposición para reducir los posibles efectos posicionales, incluyendo ligeras variaciones de temperatura, intensidad de la luz, etc. Para obtener más información sobre la configuración de sistemas de exposición dinámica, consúltese la Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians de la ASTM (16).

Distribución del producto: preparación de las soluciones de ensayo

19. Para realizar las soluciones de ensayo en el sistema de exposición, la solución del producto problema debe administrarse al sistema de exposición mediante una bomba adecuada u otro aparato. El caudal de la solución madre debe calibrarse de acuerdo con la confirmación analítica de las soluciones problema antes del inicio de la exposición, y comprobarse volumétricamente con regularidad durante el ensayo. La solución de ensayo de cada cámara debe ser objeto como mínimo de cinco renovaciones de volumen al día.

20. El método utilizado para introducir el producto problema en el sistema puede variar en función de sus propiedades fisicoquímicas. Por tanto, antes del ensayo debe obtenerse la información de referencia sobre el producto que sea pertinente para determinar su capacidad de someterse al ensayo. Entre la información útil sobre las propiedades específicas del producto problema se incluyen la fórmula estructural, el peso molecular, la pureza, la estabilidad en el agua y ante la luz, el pK_a y el K_{ow} , la solubilidad en el agua (preferiblemente en el medio de ensayo) y la presión de vapor, así como los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil [método de ensayo C.4 (17) o C.29 (18)]. La solubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará si se van a producir pérdidas debido a la evaporación del producto problema. La realización de este ensayo sin la información indicada más arriba debe considerarse cuidadosamente, ya que el diseño del estudio depende de las propiedades fisicoquímicas del producto problema y, sin esos datos, los resultados del ensayo pueden ser difíciles de interpretar o incluso carecer de sentido. Para cuantificar el producto problema en las soluciones del ensayo, debe disponerse de un método analítico fiable, cuyo límite de detección y cuya exactitud sean conocidos y se hayan comunicado. Los productos hidrosolubles pueden disolverse en alícuotas de agua de dilución a una concentración que permita su suministro a la concentración objetivo del ensayo en un sistema dinámico. Los productos líquidos o sólidos a temperatura ambiente y moderadamente hidrosolubles pueden requerir el uso de una columna de saturación líquido:líquido o líquido:sólido (por ejemplo, columna de lana de vidrio) (19). Aunque también cabe la posibilidad de administrar productos problema muy hidrófobos por la vía de los alimentos, hasta la fecha ha habido poca experiencia con esa vía de exposición en este ensayo.
21. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución con medios mecánicos (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Para lograr la concentración adecuada de la solución madre pueden emplearse columnas o sistemas de saturación o métodos de administración pasiva (20). Lo preferible es utilizar un sistema de ensayo sin cosolventes; sin embargo, los distintos productos problema tendrán propiedades fisicoquímicas diversas que probablemente requerirán enfoques diferentes para la preparación del agua de exposición al producto. Deben hacerse todos los esfuerzos posibles para evitar tener que recurrir a disolventes o vehículos: 1) el uso de determinados disolventes puede desembocar en toxicidad o en respuestas indeseables o imprevistas; 2) la concentración de productos problema por encima de su hidrosolubilidad (como puede ocurrir con frecuencia si se utilizan disolventes) puede hacer que sean inexactas las determinaciones de las concentraciones efectivas; 3) el uso de disolventes en ensayos a largo plazo puede dar lugar a la formación de “biopelícula” en un grado significativo, asociada con una actividad microbiana que puede afectar a las condiciones medioambientales, así como a la capacidad

de mantener las concentraciones de exposición, y 4) a falta de datos históricos que demuestren que el disolvente no influye en los resultados del estudio, el uso de disolventes impone la realización de un control del disolvente con implicaciones para el bienestar de los animales, ya que han de utilizarse más animales para llevar a cabo el ensayo. En caso de productos difíciles de ensayar, es posible utilizar un disolvente como último recurso, y debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (21). La elección del disolvente debe venir determinada por las propiedades químicas del producto problema y por la disponibilidad de datos históricos de testigos del disolvente. A falta de datos históricos, debe determinarse la idoneidad de un disolvente antes de realizar el estudio definitivo. En caso de que sea inevitable la utilización de un disolvente, y de que se encuentre actividad microbiana (biopelícula), se recomienda registrar/comunicar la formación de biopelícula por recipiente (al menos una vez por semana) a lo largo de todo el ensayo. Lo ideal es que la concentración de disolvente se mantenga constante en el control del disolvente y en todos los tratamientos de ensayo. Si la concentración del disolvente no se mantiene constante, en el control de disolvente debe utilizarse la mayor concentración de disolvente que se encuentre en el tratamiento de ensayo. En los casos en que se utilicen vehículos disolventes, las concentraciones máximas de disolvente no deben superar los 100 µl/l o 100 mg/l (21), y se recomienda mantener la concentración de disolvente lo más baja posible (p. ej., ≤ 20 µl/l) para evitar cualquier posible efecto del disolvente sobre los parámetros medidos (22).

Animales de experimentación

Especie de ensayo

22. La especie de ensayo es *X. laevis* por los siguientes motivos: 1) se cultiva habitualmente en laboratorios de todo el mundo, 2) puede obtenerse fácilmente a través de proveedores comerciales y 3) es posible determinar su sexo genético.

Cría y cuidado de los adultos

23. La cría y el cuidado de *X. laevis* se describen en unas directrices normalizadas (23). El alojamiento y el cuidado de *X. laevis* los describe también Read (24). Para inducir la reproducción, de tres a cinco parejas de hembras y machos adultos reciben por inyección intraperitoneal gonadotropina coriónica humana (hCG). Se administran a especímenes femeninos y masculinos, por ejemplo, unas 800-1 000 UI y 500-800 UI, respectivamente, de hCG disuelta en solución salina al 0,6-0,9 % (o en solución de Ringer para ranas, que es una solución salina isotónica para uso con anfibios; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Los volúmenes de inyección deben ser de aproximadamente 10 µl/g de peso corporal (~ 1 000 µl). A

continuación, las parejas de cría se mantienen en grandes recipientes, sin alteraciones y en condiciones estáticas con el objeto de fomentar el amplexo. El fondo de cada recipiente de cría debe tener un fondo falso de malla de acero inoxidable (p. ej., aberturas de 1,25 cm) que permita que los huevos caigan al fondo del recipiente. Normalmente, las ranas a las que se haya inyectado la hCG a última hora de la tarde depositarán la mayor parte de sus huevos a media mañana del día siguiente. Cuando se haya liberado y fertilizado una cantidad suficiente de huevos, deben retirarse los adultos de los recipientes de cría. A continuación, se recogen los huevos y se eliminan las capas de gelatina mediante tratamiento con L-cisteína (23). Hay que preparar una solución de L-cisteína al 2 % y ajustar su pH a 8,1 con NaOH 1 M. Esta solución a 21 °C se añade a un Erlenmeyer de 500 ml que contiene los huevos de un único desove y se agita moviendo suavemente de forma circular el recipiente durante uno o dos minutos y a continuación se enjuaga a fondo entre 6 y 8 veces con agua de cultivo a 21 °C. A continuación, se transfieren los huevos a un cristalizador y se determina si su viabilidad es > 70 % con anomalías mínimas en los embriones que muestran división celular.

DISEÑO DEL ENSAYO

Concentraciones de ensayo

24. Se recomienda utilizar un mínimo de cuatro concentraciones del producto y los testigos adecuados (incluidos los controles del disolvente, en caso necesario). En general, se recomienda espaciar las concentraciones con un factor de separación inferior o igual a 3,2.
25. A efectos del presente ensayo, los resultados de los estudios existentes con anfibios deben utilizarse, en la medida de lo posible, para determinar la mayor concentración de ensayo a fin de evitar concentraciones manifiestamente tóxicas. Puede contribuir a establecer esta concentración la información procedente de, por ejemplo, las relaciones cuantitativas estructura/actividad, la extrapolación y los datos de estudios existentes con anfibios, como el ensayo sobre metamorfosis de anfibios [método de ensayo C.38 (25)] y el ensayo de teratogénesis con embriones de rana - *Xenopus* (23), y/o ensayos con peces, como los métodos de ensayo C.48, C.41 y C.49 (26) (27) (28). Antes de la realización del LAGDA puede llevarse a cabo un experimento de determinación del intervalo. Se recomienda que la exposición para determinar el intervalo se inicie en el plazo de 24 horas desde la fertilización y se continúe durante 7-14 días (o más, si es necesario), y que las concentraciones de ensayo se fijen de tal manera que la separación entre ellas no sea superior a un factor de 10. Los resultados del experimento de determinación del intervalo deben servir para fijar la concentración de ensayo más elevada en el LAGDA. Téngase en cuenta que, si hay que utilizar un disolvente, la idoneidad del disolvente (es decir, si puede afectar al resultado del estudio) podría determinarse como parte del estudio de determinación del intervalo.

Réplicas dentro de los grupos de tratamiento y testigos

26. Debe utilizarse un mínimo de cuatro recipientes replicados por concentración de ensayo y un mínimo de ocho réplicas de los testigos (y el control del disolvente, en caso necesario) (es decir, el número de réplicas de los testigos y del eventual control del disolvente debe ser el doble del número de réplicas de cada grupo de tratamiento, con el fin de garantizar una potencia estadística adecuada). Cada réplica debe contener un máximo de 20 animales. El número mínimo de animales manejados sería de 15 (5 para la submuestra de la fase NF 62 y 10 juveniles). No obstante, se añaden animales adicionales a cada réplica para tener en cuenta la posibilidad de mortalidad, manteniendo al mismo tiempo el número crítico de 15.

PROCEDIMIENTO

Resumen del procedimiento

27. El ensayo se inicia con embriones recién desovados (fase NF 8-10) y continúa en la fase de desarrollo de los juveniles. Los animales se examinan diariamente para observar si hay mortalidad y signos de comportamiento anómalo. En la fase NF 62 se recoge una submuestra de larvas (de hasta 5 animales por réplica) y se examinan varios parámetros (cuadro 1). Después de que todos los animales hayan alcanzado la fase NF 66, es decir, la finalización de la metamorfosis (o 70 días después de la iniciación del ensayo, si esta fecha es anterior), se hace un sacrificio parcial al azar (pero sin submuestreo) para reducir el número de animales (10 por recipiente) (véase el punto 43), y los demás animales siguen adelante con la exposición hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 del testigo. A la terminación del ensayo (muestreo de juveniles) se efectúan mediciones adicionales (cuadro 1).

Condiciones de exposición

28. En el apéndice 3 figura un resumen completo de los parámetros del ensayo. Durante el período de exposición, deben medirse diariamente el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH de las soluciones de ensayo. La conductividad, la alcalinidad y la dureza se miden una vez al mes. En cuanto a la temperatura del agua de las soluciones de ensayo, las diferencias entre réplicas y entre tratamientos (dentro del mismo día) no deben superar el valor de 1,0 °C. Asimismo, en cuanto al pH de las soluciones de ensayo, las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben ser superiores a 0,5.
29. De los recipientes de exposición se pueden retirar cada día mediante un sifón los alimentos no consumidos y los productos residuales, teniendo cuidado de evitar la contaminación cruzada de los recipientes. Debe procurarse reducir al mínimo el estrés y los traumatismos causados a los animales, en particular durante los traslados, la limpieza de los acuarios y la

manipulación. Deben evitarse las condiciones o actividades estresantes, como el ruido fuerte o incesante, los golpes en los acuarios y las vibraciones en los recipientes.

Duración de la exposición al producto problema

30. La exposición se inicia con embriones recién desovados (fase NF 8-10) y continúa hasta diez semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 (≤ 45 días desde el inicio del ensayo) en el grupo testigo. En general, la duración del LAGDA es de 16 semanas (17 semanas como máximo).

Inicio del ensayo

31. Los animales parentales utilizados para el inicio del ensayo deberán haber demostrado previamente que consiguen descendientes cuyo sexo puede ser genéticamente asignado (apéndice 5). Después de que los adultos hayan desovado, los embriones se recogen, se tratan con cisteína para eliminar la capa de gelatina y se someten a cribado según su viabilidad (23). El tratamiento con cisteína permite que los embriones sean manipulados durante el cribado sin adherirse a las superficies. El cribado se lleva a cabo bajo un microscopio de disección, utilizando una pipeta de tamaño adecuado para retirar los embriones inviables. Es preferible utilizar para el ensayo un único desove que dé lugar a una viabilidad superior al 70 %. Los embriones en la fase NF 8-10 se distribuyen aleatoriamente en recipientes de tratamiento de exposición que contengan un volumen adecuado de agua de dilución hasta que cada recipiente contenga 20 embriones. Los embriones deben tratarse con cuidado durante este traslado para minimizar el estrés por manipulación y evitar lesiones. Al cabo de 96 horas después de la fertilización, los renacuajos deben haber subido por la columna de agua y comenzado a pegarse a los laterales del recipiente.

Régimen de alimentación

32. El cambio del tipo y de la dosis de la alimentación durante las diferentes etapas de la vida de *X. laevis* es un aspecto muy importante del protocolo del LAGDA. Una alimentación excesiva durante la fase larvaria suele dar lugar a un aumento de la incidencia de escoliosis y de su gravedad (apéndice 8), y debe evitarse. Por el contrario, una alimentación inadecuada durante la fase larvaria da lugar a unas tasas de desarrollo muy variables entre los testigos, lo que podría poner en peligro la potencia estadística o confundir los resultados de los ensayos. En el apéndice 4 se facilitan la dieta recomendada y los regímenes alimentarios para *X. laevis* en condiciones dinámicas, pero son admisibles otras posibilidades siempre que los organismos de ensayo crezcan y se desarrollen de forma satisfactoria. Es importante señalar que, si se miden parámetros específicos del sistema endocrino, los alimentos deben estar exentos de sustancias activas sobre este sistema, como es la harina de soja.

Alimentación de las larvas

33. La dieta recomendada para las larvas consiste en alimento inicial para truchas, discos del alga *Spirulina* y copos para peces de colores (por ejemplo, TetraFin[®], de Tetra, Alemania) mezclados en agua de cultivo (o de dilución). Esta mezcla se administra tres veces al día en días laborables y una vez al día los fines de semana. Los renacuajos también se alimentan con nauplios de 24 h de edad de artemia salina, *Artemia* spp., dos veces al día en días laborables y una vez al día en los fines de semana, a partir del día 8 tras la fertilización. La alimentación de las larvas, que debe ser la misma en cada recipiente de ensayo, ha de permitir un crecimiento y un desarrollo adecuados de los animales de ensayo, a fin de garantizar la reproducibilidad y transferibilidad de los resultados del ensayo: 1) el tiempo mediano hasta la fase NF 62 en los testigos debe ser ≤ 45 días y 2) es recomendable un peso medio de $1,0 \pm 0,2$ g en la fase NF 62 en los testigos.

Alimentación de los juveniles

34. Una vez que se haya completado la metamorfosis, el régimen de alimentación consiste en comida sumergible de alta calidad para ranas, por ejemplo Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, EE. UU.). En el caso de las ranas jóvenes (fases tempranas de juveniles), los copos se pasan brevemente por un molinillo de café o batidora, o se trituran en un mortero para reducir su tamaño. Una vez que los juveniles son lo suficientemente grandes para consumir copos enteros, ya deja de ser necesario triturarlos o molerlos. Los animales deben recibir el alimento una vez al día. La alimentación de los juveniles debe permitir el crecimiento y desarrollo adecuados de los organismos: se recomienda un peso medio de $11,5 \pm 3$ g en los juveniles del testigo al término del ensayo.

Química analítica

35. Antes del inicio del ensayo, deben determinarse la estabilidad del producto problema (p. ej., solubilidad, degradabilidad y volatilidad) y todos los métodos analíticos necesarios, por ejemplo utilizando la información o los conocimientos existentes. Cuando se administre el producto a través del agua de dilución, se recomienda analizar las soluciones de ensayo de cada recipiente en paralelo antes del inicio del ensayo para verificar el comportamiento del sistema. Durante el período de exposición, las concentraciones del producto problema se determinan a intervalos apropiados, de preferencia cada semana al menos en una réplica de cada grupo de tratamiento, rotando cada semana entre las réplicas del mismo grupo de tratamiento. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de producto problema en la solución se ha mantenido debidamente dentro del $\pm 20\%$ de la concentración nominal durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse tanto en los valores nominales como en los valores medidos. Asimismo, el coeficiente de variación (CV) de la concentración de ensayo medida durante todo el período de ensayo dentro de un tratamiento debe ser igual o inferior al 20 % en

cada concentración. Cuando las concentraciones medidas no se mantengan en el intervalo del 80-120 % de la concentración nominal (por ejemplo, cuando se someten a ensayo productos muy biodegradables o adsorbentes), las concentraciones con efecto deben determinarse y expresarse en relación con la media aritmética de la concentración en los ensayos dinámicos.

36. A lo largo de toda la duración de la exposición, los caudales de agua de dilución y de solución madre deben comprobarse a intervalos apropiados (por ejemplo, tres veces por semana). En el caso de los productos que no pueden detectarse a alguna de las concentraciones nominales o a todas ellas (por ejemplo, debido a una rápida degradación o adsorción en los recipientes de ensayo, o a la marcada acumulación del producto en los cuerpos de los animales expuestos), se recomienda que la tasa de renovación de la solución de ensayo en cada cámara se adapte para mantener las concentraciones de ensayo lo más constantes posible.

Observaciones y medición de los parámetros

37. Los parámetros evaluados en el transcurso de la exposición son los indicativos de toxicidad, incluida la mortalidad, el comportamiento anormal, como los signos clínicos de enfermedad y/o la toxicidad general, y las determinaciones del crecimiento (longitud y peso), así como los parámetros de histopatología que puedan responder tanto a la toxicidad general como a los modos de acción endocrinos relacionados con rutas en las que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas. Además, se puede medir opcionalmente la concentración plasmática de VTG al término del ensayo. La medición de la VTG puede ser útil para comprender los resultados del estudio en el contexto de los mecanismos endocrinos en relación con alteradores endocrinos sospechosos. Los parámetros y el calendario de las mediciones se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1: Resumen de los parámetros del LAGDA

Parámetros*	Cada día	Muestreo intermedio (muestreo de larvas)	Terminación del ensayo (muestreo de juveniles)
Mortalidad y anomalías	X		
Tiempo hasta la fase NF 62		X	
Histo(pato)logía (glándula tiroidea)		X	
Morfometría (crecimiento en peso y longitud)		X	X
Índice hepatosomático (IHS)			X
Proporción de sexos			X

genéticos/fenotípicos			
Histopatología (gónadas, conductos genitales, riñón e hígado)			X
Vitelogenina (VTG) (opcional)			X

* Se analizan todos los parámetros estadísticamente.

Mortalidad y observaciones diarias

38. Cada día hay que comprobar si hay animales muertos en todos los recipientes del ensayo; las cifras de muertes de cada recipiente deben quedar registradas. Los animales muertos deben extraerse del recipiente del ensayo en cuanto se observen. La fase de desarrollo de los animales muertos debe clasificarse, bien como anterior a la fase NF 58 (antes de la aparición de las patas delanteras), fase NF 58 - fase NF 62, fase NF 63 - fase NF 66 (entre la fase NF 62 y la absorción completa de la cola), o bien tras la fase NF 66 (posterior a la etapa larvaria). Las tasas de mortalidad que superen el 20 % podrían indicar unas condiciones incorrectas del ensayo o efectos manifiestamente tóxicos del producto problema. Los animales suelen ser más sensibles a la mortalidad no inducida por el producto durante los primeros días de desarrollo tras el desove y durante el apogeo de la metamorfosis. Esta mortalidad podría mostrarse en los datos de los testigos.
39. Además, deben registrarse las eventuales observaciones de comportamiento anormal, malformaciones macroscópicas visibles (p. ej., escoliosis) o lesiones. Las observaciones de escoliosis deben contabilizarse (incidencia) y clasificarse con respecto a la gravedad (por ejemplo, no relevante - NR, mínima - 1, moderada - 2, grave - 3; apéndice 8). Deben hacerse esfuerzos para garantizar que durante todo el estudio sea limitada la prevalencia de la escoliosis moderada y grave (por ejemplo, por debajo del 10 % en los testigos), si bien una prevalencia mayor de las anomalías en los testigos no sería necesariamente razón para detener el ensayo. El comportamiento normal de las larvas se caracteriza por su suspensión en la columna de agua con la cola elevada por encima de la cabeza, el movimiento regular y rítmico de la aleta caudal, la subida periódica a la superficie, la formación del opérculo y la respuesta ante estímulos. Entre los comportamientos anómalos se incluiría, por ejemplo, flotar en la superficie, quedarse en el fondo del recipiente, nadar de forma inversa o irregular, no subir a la superficie y no presentar respuesta ante estímulos. En el caso de los animales postmetamórficos, además de los comportamientos anómalos recién citados, deben registrarse las diferencias marcadas en el consumo de alimentos entre los distintos grupos de tratamiento. Las malformaciones y lesiones macroscópicas podrían incluir anomalías morfológicas (por ejemplo, deformidades de las extremidades), lesiones hemorrágicas, edema abdominal, e infecciones bacterianas o fúngicas, entre otras. La presencia de lesiones en la cabeza de los juveniles, justo detrás de las narinas, puede ser indicio de niveles insuficientes de humedad. Estas determinaciones son cualitativas, deben

considerarse similares a las manifestaciones clínicas de enfermedad o estrés, y efectuarse en comparación con los animales testigo. Si la tasa de incidencia es mayor en los recipientes expuestos que en los testigos, se debe considerar como prueba de toxicidad manifiesta.

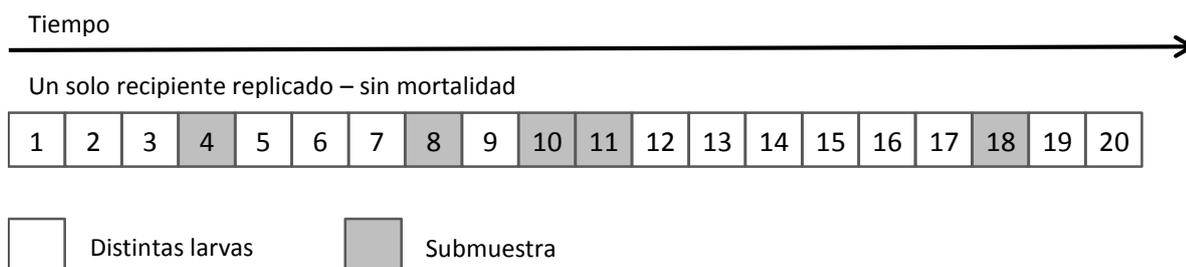
Submuestreo de larvas

Esquema del muestreo de larvas:

40. Los renacuajos que hayan alcanzado la fase NF 62 deben retirarse de los recipientes y ser objeto de muestreo o pasarse para la parte siguiente de la exposición a un depósito nuevo, o separarse físicamente de los renacuajos restantes en el mismo recipiente con un separador. Los renacuajos se observan diariamente y se anota el día del estudio en que un renacuajo concreto alcanza la fase NF 62. La característica definitoria que debe utilizarse en esta evaluación es la forma de la cabeza. Una vez que la cabeza se ha reducido en tamaño de tal modo que a la vista su anchura es aproximadamente la misma que la del tronco del renacuajo y las extremidades anteriores al nivel del centro del corazón, entonces se considerará que ese animal ha alcanzado la fase NF 62.
41. El objetivo es tomar muestras de un total de cinco renacuajos en la fase NF 62 por recipiente replicado. Esto debería llevarse a cabo de forma totalmente aleatoria pero decidida *a priori*. En la **figura 1** se presenta un ejemplo hipotético de un recipiente replicado. Si en un recipiente concreto hay 20 renacuajos supervivientes cuando el primer individuo alcanza la fase NF 62, deben elegirse cinco números aleatorios entre el 1 y el 20. El renacuajo n.º 1 es el primer individuo que llega a la fase NF 62 y el renacuajo n.º 20 es el último individuo de un recipiente que llega a la fase NF 62. Análogamente, si hay 18 larvas supervivientes en un recipiente, deben elegirse cinco números aleatorios entre el 1 y el 18. Esto debe hacerse con cada recipiente replicado cuando el primer individuo del ensayo llega a la fase NF 62. Si se producen muertes durante el muestreo de la fase NF 62, las muestras restantes deben volver a aleatorizarse sobre la base de cuántas larvas quedan por debajo de la fase NF 62 y de cuántas muestras más son necesarias para alcanzar un total de cinco muestras de esa réplica. El día en que un renacuajo llega a la fase NF 62, se acude al diagrama de muestreo preparado para determinar si ese individuo es objeto de muestreo o se separa físicamente de los renacuajos restantes para seguir con la exposición. En el ejemplo proporcionado (figura 1), el primer individuo que llega a la fase NF 62 (es decir, casilla n.º 1) se separa físicamente de las otras larvas, continúa la exposición y se registra el día del estudio en que ese individuo ha llegado a la fase NF 62. Posteriormente, los individuos n.º 2 y n.º 3 se tratan del mismo modo que el n.º 1 y, a continuación, se muestrea el individuo n.º 4 en cuanto al crecimiento y la histología de la tiroides (con arreglo a este ejemplo). Este procedimiento continúa hasta que el individuo n.º 20 se incorpora al resto de los individuos de fase NF posterior a la 62 o es objeto de muestreo. El

procedimiento aleatorio utilizado debe garantizar la misma probabilidad de selección a cada organismo del ensayo. Esto puede conseguirse utilizando cualquier método de aleatorización, pero también exige que cada renacuajo se recoja con red en algún momento a lo largo del período de submuestreo de la fase NF 62.

Figura 1: Ejemplo hipotético de régimen de muestreo de la fase NF 62 con un solo recipiente replicado.



42. En el submuestreo de larvas, los parámetros obtenidos son: 1) tiempo hasta la fase NF 62 (es decir, número de días entre la fertilización y la fase NF 62), 2) anomalías externas, 3) morfometría (p. ej., peso y longitud) y 4) histología de la tiroides.

Sacrificio compasivo de los renacuajos

43. La submuestra de los renacuajos de la fase NF 62 (5 individuos por réplica) debe sacrificarse de forma compasiva mediante inmersión durante 30 minutos en cantidades adecuadas (p. ej., 500 ml) de solución anestésica (por ejemplo, solución al 0,3 % de MS-222, metanosulfonato de triclaína, n.º CAS 886-86-2). La solución de MS-222 debe amortiguarse con bicarbonato sódico a un pH de aproximadamente 7,0, ya que la solución de MS-222 sin amortiguar es ácida e irritante para la piel de las ranas, lo que da lugar a una absorción deficiente y a un estrés adicional innecesario para los animales.
44. Utilizando una red con cerco, se retira un renacuajo de la cámara experimental y se lleva a la solución de sacrificio compasivo. Se sacrifica adecuadamente al animal, que está listo para la autopsia cuando no responde a estímulos externos, como el pellizcar la extremidad posterior con un par de pinzas.

Morfometría (peso y longitud)

45. Las mediciones del peso húmedo (con precisión de 1 mg) y de la longitud del hocico a la cloaca (SVL, *snout-to-vent length*) (con precisión de 0,1 mm) de cada renacuajo debe realizarse inmediatamente después de que el animal deje de responder por efecto de la anestesia (figura 2a). Para medir la SVL a partir de una fotografía se podrá utilizar un programa informático de análisis de imágenes. Los renacuajos se secan con material absorbente antes de pesarse, para eliminar el exceso de agua adherida. Después de efectuar las mediciones del tamaño (peso y SVL) se deben registrar o anotar las eventuales

anomalías morfológicas macroscópicas y/o signos clínicos de toxicidad como escoliosis (véase el apéndice 8), petequias y hemorragia, y se recomienda la documentación digital. Téngase en cuenta que las petequias son pequeñas hemorragias rojas o púrpura en los capilares de la piel.

Recogida y fijación de tejidos

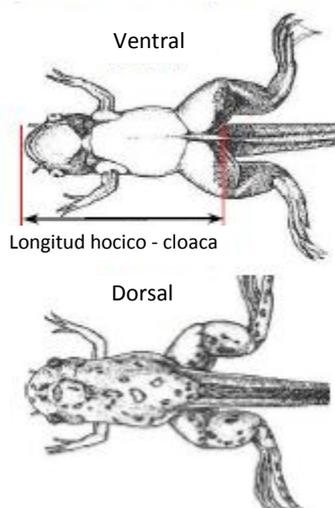
46. En la submuestra de las larvas, se realiza una evaluación de la histología de la glándula tiroidea. Se retira y desecha el tronco inferior posterior a las extremidades anteriores. La canal cortada se fija en fijador de Davidson. El volumen de fijador del recipiente debe ser, como mínimo, diez veces el volumen aproximado de los tejidos. Para fijar adecuadamente los tejidos de interés debe aplicarse una agitación o una circulación adecuadas de la solución fijadora. Todos los tejidos permanecen en fijador de Davidson durante al menos 48 horas, pero no más de 96 horas, tras lo cual se lavan en agua desionizada y se conservan en formol al 10 % amortiguado a pH neutro (1) (29).

Histología de la glándula tiroidea

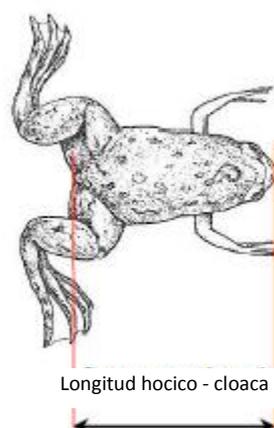
47. Las glándulas tiroideas de cada submuestra de larvas (con los tejidos fijados) se evalúan histológicamente, es decir, se efectúa un diagnóstico y una clasificación de la gravedad (29) (30).

Figura 2: Puntos de referencia para medir la longitud del hocico a la cloaca correspondiente al LAGDA en la fase NF 62 (a) y en ranas juveniles (b). Características definitorias de la fase NF 62 (a): la cabeza tiene la misma anchura que el tronco, la longitud del nervio olfativo es menor que el diámetro del bulbo olfativo (vista dorsal), y las extremidades anteriores se encuentran al nivel del corazón (vista ventral). Imágenes adaptadas de Nieuwkoop y Faber (1994).

a. Submuestra de larvas (fase NF 62)



b. Muestreo de juveniles



Final de la exposición de las larvas

48. Dado el número inicial de renacuajos, se prevé que probablemente habrá un pequeño porcentaje de individuos que no se desarrollen normalmente y no completan la metamorfosis (fase NF 66) en un plazo razonable. La porción de la exposición en fase larvaria no debe ser superior a 70 días. Los renacuajos que permanezcan al final de este período deben sacrificarse de forma compasiva (véase el punto 43), su peso húmedo y SVL deben medirse, se les debe asignar una fase según Nieuwkoop y Faber, 1994, y deben anotarse las eventuales anomalías del desarrollo.

Sacrificio parcial tras la fase NF 66

49. Deben mantenerse diez individuos por recipiente después de la fase NF 66 (reabsorción completa de la cola) hasta la terminación de la exposición. Por tanto, después de que todos los animales hayan alcanzado la fase NF 66 o bien después de 70 días (lo que ocurra primero), debe procederse a un sacrificio parcial. Deben seleccionarse aleatoriamente los animales tras la fase NF 66 que no continúen con la exposición.
50. Se sacrifican de forma compasiva los animales que no se seleccionen para seguir con la exposición (véase el punto 43). Se realizan con cada animal mediciones de la fase de desarrollo, peso húmedo y SVL (figura 2b) y una autopsia macroscópica. Se anota el sexo fenotípico (sobre la base de la morfología de las gónadas) como hembra, macho o indeterminado.

Muestreo de juveniles

Esquema del muestreo de juveniles

51. El resto de los animales sigue con la exposición hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo del agua de dilución (y/o en el control del disolvente, si procede). Al final del período de exposición, se sacrifican de forma compasiva los animales restantes (hasta un máximo de 10 ranas por réplica), y se miden o evalúan los diversos parámetros, y se registran: 1) la morfometría (peso y longitud), 2) la proporción de sexos fenotípicos/genotípicos, 3) el peso del hígado (índice hepatosomático), 4) la histopatología (gónadas, conductos genitales, riñón e hígado) y, de formal opcional, 5) la VTG plasmática.

Sacrificio compasivo de las ranas

52. Las muestras de juveniles, ranas postmetamórficas, se sacrifican de forma compasiva mediante inyección intraperitoneal de anestésico, por ejemplo MS-222 al 10 % en una solución amortiguadora de fosfato adecuada. Pueden tomarse muestras de las ranas después de que dejen de reaccionar (generalmente en torno a 2 minutos después de la inyección, si se utiliza MS-222 al 10 % a la dosis de 0,01 ml/g de rana). Si bien las ranas

juveniles pueden sumergirse en solución de anestésico (MS-222) de mayor concentración, la experiencia ha demostrado que se tarda más tiempo en lograr la anestesia mediante este método y la duración puede no ser adecuada para permitir el muestreo. La inyección proporciona una eutanasia rápida y eficiente antes de la toma de muestras. No debe iniciarse el muestreo hasta que se haya confirmado la ausencia de respuesta de las ranas para garantizar que los animales están muertos. Si las ranas muestran signos de sufrimiento considerable (que sea muy intenso, y que pueda predecirse de manera fiable la muerte) y se consideran moribundas, los animales deben anestesiarse y sacrificarse de forma compasiva, y estos casos deben tratarse como mortalidad a efectos del análisis de los datos. Cuando se sacrifica una rana debido a la morbilidad, este extremo debe tenerse en cuenta y registrarse. En función del momento en que se sacrifique la rana durante el estudio, se puede conservar la rana para llevar a cabo un análisis histopatológico (fijando la rana con vistas al posible estudio de su histopatología).

Morfometría (peso y longitud)

53. Las mediciones del peso húmedo y de la SVL (figura 2b) son idénticas a las señaladas en el submuestreo de larvas.

VTG plasmática (opción)

54. La VTG es un biomarcador ampliamente aceptado derivado de la exposición a sustancias estrogénicas. Para el LAGDA, la VTG plasmática puede medirse opcionalmente en muestras de juveniles (esto puede ser especialmente pertinente si se sospecha que el producto problema es un estrógeno).
55. Se cortan las extremidades posteriores de juveniles sacrificados de forma compasiva y se recoge sangre con un capilar heparinizado (aunque pueden ser adecuados otros métodos de recogida de sangre, como la punción cardíaca). La sangre se pasa a un tubo de microcentrifugación (p. ej., de 1,5 ml de volumen) y se centrifuga para obtener plasma. Las muestras de plasma deben almacenarse a la temperatura máxima de -70 °C hasta la determinación de la VTG. La concentración de la VTG plasmática puede medirse mediante un método de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) (apéndice 6), o mediante un método alternativo como la espectrometría de masas (31). Se prefieren los anticuerpos específicos de la especie debido a su mayor sensibilidad.

Determinación del sexo genético

56. El sexo genético de cada rana juvenil se evalúa sobre la base de los marcadores desarrollados por Yoshimoto *et al.* (11). Para determinar el sexo genético, una porción (o la totalidad) de una extremidad posterior (o de cualquier otro tejido) que se haya retirado durante la disección se recoge y conserva en un tubo de microcentrifugación (las muestras de tejido de las ranas pueden obtenerse a partir de cualquier tejido). Los tejidos pueden

conservarse a la temperatura máxima de -20 °C hasta el aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN). El aislamiento del ADN de los tejidos puede efectuarse con juegos disponibles en el mercado, y el análisis para detectar la presencia o ausencia del marcador se realiza mediante un método de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (apéndice 5). Generalmente, la concordancia entre el sexo histológico y el genotipo en todos los animales testigo en el momento del muestreo de juveniles en los grupos testigos es superior al 95 %.

Recogida de tejidos y fijación para el estudio de la histopatología

57. Se recogen las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados para llevar a cabo un análisis histológico durante el muestreo final. Se abre la cavidad abdominal y se extrae y pesa el hígado. A continuación, los órganos digestivos (p. ej., estómago, intestinos) se retiran cuidadosamente de la parte inferior del abdomen para dejar a la vista las gónadas, los riñones y los conductos genitales. Deben registrarse las eventuales anomalías morfológicas macroscópicas de las gónadas. Por último, deben retirarse las extremidades posteriores si no se habían retirado previamente para la extracción de sangre. Los hígados recogidos y las canales con las gónadas dejadas *in situ* deben ponerse inmediatamente en fijador de Davidson. El volumen de fijador del recipiente debe ser, como mínimo, diez veces el volumen aproximado de los tejidos. Todos los tejidos permanecen en fijador de Davidson durante al menos 48 horas, pero no más de 96 horas, tras lo cual se lavan en agua desionizada y se conservan en formol al 10 % amortiguado a pH neutro (1) (29).

Histopatología

58. Cada muestra de juveniles se evalúa en cuanto a la histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y el tejido hepático, es decir, se efectúa un diagnóstico y una clasificación de la gravedad (32). El fenotipo de las gónadas se obtiene también de esta evaluación (p. ej., ovarios, testículos, hermafroditismo) y, junto con las valoraciones individuales del sexo genético, estas observaciones se pueden utilizar para calcular la proporción de sexos fenotípicos/genotípicos.

PRESENTACIÓN DE DATOS

Análisis estadístico

59. El LAGDA genera tres tipos de datos que se han de analizar estadísticamente: 1) datos cuantitativos continuos (peso, SVL, IHS, VTG), 2) datos de tiempo hasta un evento en cuanto a las tasas de desarrollo (es decir, días hasta la fase NF 62 desde la iniciación del ensayo) y 3) datos ordinales en forma de puntuaciones de gravedad o fases de desarrollo a partir de las evaluaciones de histopatología.

60. Se recomienda que el diseño del ensayo y la selección de la prueba estadística aporten una potencia adecuada para detectar los cambios de importancia biológica en los parámetros respecto a los que debe comunicarse una NOEC o una CEx. Es preferible que los análisis estadísticos de los datos (en general, sobre la base de la media de las réplicas) sigan los procedimientos descritos en el Documento sobre enfoques actuales del análisis de datos de ecotoxicidad, orientaciones sobre la aplicación (33). En el apéndice 7 del presente método de ensayo figura el árbol de decisiones de análisis estadísticos recomendado y la orientación para el tratamiento de los datos y la elección del ensayo o modelo estadístico más adecuado para su uso en el LAGDA.
61. Los datos del muestreo de juveniles (p. ej., crecimiento, IHS) deben analizarse respecto a cada sexo genotípico por separado, ya que el sexo genotípico se determina en todas las ranas.

Consideraciones relativas al análisis de los datos

Uso de réplicas y tratamientos alterados

62. Las réplicas y los tratamientos pueden verse alterados debido al exceso de mortalidad por toxicidad manifiesta, enfermedad o error técnico. Si un tratamiento está alterado debido a una enfermedad o a un error técnico, debe haber tres tratamientos no alterados con tres réplicas no alteradas disponibles para el análisis. Si se produce toxicidad manifiesta en el tratamiento o tratamientos elevados, es preferible que haya al menos tres niveles de tratamiento con tres réplicas no alteradas disponibles para su análisis [en consonancia con el enfoque de concentración máxima tolerada para las directrices de ensayo de la OCDE (34)]. Además de la mortalidad, entre los signos de toxicidad manifiesta se pueden incluir efectos sobre el comportamiento (por ejemplo, flotar en la superficie, quedarse en el fondo del recipiente, nadar de forma inversa o irregular, no subir a la superficie), lesiones morfológicas (por ejemplo, lesiones hemorrágicas, edema abdominal) o inhibición de respuestas de alimentación normales en comparación cualitativa con los animales testigo.

Control del disolvente

63. Al finalizar el ensayo, debe efectuarse una evaluación de los efectos potenciales del disolvente (si se utiliza). Esto se realiza mediante una comparación estadística del grupo de control del disolvente y del grupo testigo del agua de dilución. Los parámetros más pertinentes que deben tenerse en cuenta en este análisis son los factores determinantes del crecimiento (peso y longitud), ya que pueden verse afectados por una toxicidad generalizada. Si se detectan diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre el grupo testigo del agua de dilución y el grupo control del disolvente, debe aplicarse el mejor juicio profesional para determinar si está afectada la validez del ensayo. Si los dos grupos difieren, deben compararse con el control del disolvente los tratamientos expuestos

al producto, a menos que se sepa que es preferible la comparación con el testigo del agua de dilución. Si no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, se recomienda comparar los tratamientos expuestos al producto problema con los grupos testigo reunidos (grupo de control del disolvente y grupo testigo del agua de dilución), a menos que se sepa que es preferible la comparación solo con el grupo testigo del agua de dilución o con el grupo de control del disolvente.

Informe del ensayo

64. El informe del ensayo debe incluir lo siguiente:

Producto problema:

- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;
- Sustancias de un solo componente:
 - aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;
 - identificación química, como nombres IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).
- Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:
 - caracterizadas 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.

Especie de ensayo:

- Nombre científico, cepa si se conoce, fuente y método de recogida de los huevos fertilizados y manipulaciones posteriores.
- Incidencia de la escolosis en los testigos históricos del cultivo madre utilizado.

Condiciones del ensayo:

- Fotoperíodo o fotoperíodos;
- Diseño del ensayo (por ejemplo, tamaño, material y volumen de agua de la cámara, número de cámaras de ensayo y de réplicas, número de organismos de ensayo por réplica);
- Método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificará el agente solubilizante empleado y su concentración);
- Método de administración del producto problema (p. ej., bombas, sistemas de dilución);

- Eficiencia de recuperación del método y concentraciones nominales de ensayo, límite de detección, medias de los valores medidos en los recipientes de ensayo y sus desviaciones típicas, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones del producto problema en disolución verdadera;
- Características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), yodo total, carbono orgánico total, sólidos en suspensión (si se ha medido), salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;
- Concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas;
- Calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, temperatura (diaria) y concentración de oxígeno disuelto;
- Información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

Resultados:

- Prueba de que los testigos satisfacen los criterios de validez:
- Datos del testigo (más control del disolvente cuando se utilice) y de los lotes de tratamiento como sigue: mortalidad y anomalías observadas, tiempo hasta la fase NF 62, evaluación histológica de la glándula tiroidea (solo en la muestra de larvas), crecimiento (peso y longitud), IHS (solo en la muestra de juveniles), proporción de sexos genéticos/fenotípicos (solo en la muestra de juveniles), resultados de la evaluación de la histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados (solo en la muestra de juveniles) y la VTG plasmática (solo en la muestra de juveniles, si se ha realizado);
- Enfoque del análisis estadístico y del tratamiento de los datos (prueba o modelo estadístico utilizado);
- Concentración sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada;
- Concentración mínima con efecto observado (LOEC) para cada respuesta evaluada (con $\alpha = 0,05$); si procede, CEx para cada respuesta evaluada e intervalos de confianza (p. ej., del 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva de concentración-respuesta, la fórmula del modelo de regresión, los parámetros estimados del modelo y sus errores típicos;
- Eventuales desviaciones del método de ensayo y de los criterios de aceptación, así como consideración de sus posibles consecuencias sobre el resultado del ensayo.

65. En cuanto a los resultados de las mediciones de los parámetros, deben presentarse los valores medios y sus desviaciones típicas (tanto en relación con las réplicas como en relación con las concentraciones, si es posible).
66. El tiempo mediano hasta la fase NF 62 en los testigos debe calcularse y presentarse como la media de las medianas de las réplicas y su desviación típica. Análogamente, en el caso de los tratamientos, la mediana del tratamiento debe calcularse y presentarse como la media de las medianas de las réplicas y su desviación típica.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OCDE (2012 a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Capítulo C.4 del presente anexo, Determinación de la biodegradabilidad “fácil”.
- (18) Capítulo C.29 del presente anexo, Biodegradabilidad fácil - CO₂ en recipientes sellados (ensayo del espacio de cabeza).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 23), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Capítulo C.38 del presente anexo, Ensayo sobre metamorfosis de anfibios.
- (26) Capítulo C.48 del presente anexo, Ensayo de reproducción de peces a corto plazo.
- (27) Capítulo C.41 del presente anexo, Ensayo de desarrollo sexual en peces.
- (28) Capítulo C.49 del presente anexo, Ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET).
- (29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No. 82) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 228), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 54), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Parámetro principal: Parámetro que causa un efecto a nivel de la población.

Producto: Sustancia o mezcla.

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción.

CEx: Concentración con efecto del x %; es la concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un testigo. Por ejemplo, una CE50 es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

dtf: Días tras la fertilización.

Ensayo dinámico: Ensayo con un flujo continuo de soluciones de ensayo por el sistema de ensayo durante la duración de la exposición.

Eje HPG: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*hypothalamic-pituitary-gonadal*).

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): Concentración más baja de producto problema con la que se observa un efecto estadístico significativo (con $p < 0,05$) en comparación con el testigo. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC). En el apéndice 7 se recogen las orientaciones pertinentes.

Concentración letal mediana (CL50): Concentración de un producto problema de la que se estima que mata al 50 % de los organismos de ensayo durante la duración del ensayo.

Concentración sin efecto observado (NOEC): Concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

SMILES: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Producto problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

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

VTG: La vitelogenina es una fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

Apéndice 2

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA

Sustancia	Límite de concentración
Partículas	5 mg/l
Carbono orgánico total	2 mg/l
Amoníaco no ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgánico total	25 ng/l
Aluminio	1 µg/l
Arsénico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Hierro	1 µg/l
Plomo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Cinc	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Plata	100 ng/l

Apéndice 3**CONDICIONES DE ENSAYO DEL LAGDA**

1. Especie de ensayo	<i>Xenopus laevis</i>
2. Tipo de ensayo	Dinámico continuo
3. Temperatura del agua	La temperatura nominal es de 21 °C. La temperatura media a lo largo de la duración del ensayo es de 21 ± 1 °C (las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben superar el valor de 1,0 °C).
	Bombillas fluorescentes (de amplio espectro) 600-2 000 lux (lúmenes por m ²) en la superficie del agua
5. Fotoperíodo	12 h de luz, 12 h de oscuridad
6. Volumen de la solución de ensayo y recipiente de ensayo	4-10 l (profundidad mínima del agua: 10-15 cm) Recipiente de vidrio o de acero inoxidable
7. Intercambios de volumen de las soluciones de ensayo	Constante, teniendo en cuenta tanto el mantenimiento de las condiciones biológicas como la exposición al producto (por ejemplo, cinco renovaciones del volumen del recipiente al día).
8. Edad de los organismos de ensayo en el momento del inicio	Fase de Nieuwkoop y Faber (NF) 8-10
9. Número de organismos por réplica	20 animales (embriones) / recipiente (réplica) al inicio de exposición y 10 animales (juveniles) / recipiente (réplica) después de la fase NF 66 hasta la terminación de la exposición.
10. Número de tratamientos	Como mínimo, cuatro tratamientos con el producto problema más el testigo o testigos adecuados
11. Número de réplicas por tratamiento	Cuatro réplicas por tratamiento con el producto problema y ocho réplicas con el testigo o testigos
12. Número de organismos por concentración del ensayo	Como mínimo ochenta animales por tratamiento con el producto problema y ciento sesenta animales con el testigo o testigos
13. Agua de dilución	Cualquier agua que permita el crecimiento y el desarrollo normales de <i>X. laevis</i> (por ejemplo, agua de manantial o agua del grifo pasada por filtro de carbón)
14. Aireación	No es obligatoria, pero puede ser necesario airear los depósitos si los niveles de oxígeno disuelto caen por debajo de los límites recomendados y aumenta al máximo el flujo de solución de ensayo.

15. Oxígeno disuelto de la solución Oxígeno disuelto: ≥ 40 % del valor de saturación del aire o $\geq 3,5$ mg/l de ensayo
16. pH de las soluciones de ensayo 6,5-8,5 (las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben superar el valor de 0,5)
17. Dureza y alcalinidad de la solución de ensayo 10-250 mg CaCO₃/l
18. Régimen de alimentación (Véase el apéndice 4)
19. Período de exposición Desde la fase NF 8-10 hasta diez semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el grupo testigo del agua y/o del disolvente (máximo de 17 semanas)
20. Parámetros biológicos Mortalidad (y anomalías observadas), tiempo hasta la fase NF 62 (muestra de larvas), evaluación histológica de la glándula tiroidea (muestra de larvas), crecimiento (peso y longitud), índice hepatosomático (muestra de juveniles), proporción de sexos genéticos/fenotípicos (muestra de juveniles), histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados (muestra de juveniles) y la vitelogenina plasmática (muestra de juveniles, opcional)
21. Criterios de validez del ensayo El oxígeno disuelto debe ser > 40 % del valor de saturación del aire; la temperatura media del agua debe ser de 21 ± 1 °C, y las diferencias entre réplicas y entre tratamientos deben ser $< 1,0$ °C; el pH de la solución de ensayo debe oscilar entre 6,5 y 8,5; la mortalidad en el testigo debe ser ≤ 20 % en cada réplica, y el tiempo medio hasta la fase NF 62 en el testigo debe ser ≤ 45 días; el peso medio de los organismos de ensayo en la fase NF 62 y a la terminación del ensayo en los testigos y, en su caso, en los controles del disolvente debe alcanzar el valor de $1,0 \pm 0,2$ y $11,5 \pm 3$ g, respectivamente; debe haber pruebas disponibles para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido debidamente dentro de un intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos.

Apéndice 4

RÉGIMEN DE ALIMENTACIÓN

Hay que señalar que, aunque se recomienda este régimen de alimentación, pueden aceptarse otras alternativas siempre que permitan que los organismos de ensayo crezcan y se desarrollen a un ritmo adecuado.

Alimentación de las larvas

Preparación de la dieta para larvas

- A. Combinación 1 : 1 (v/v) de mezcla de alimento inicial para truchas con mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente);
1. Mezcla de alimento inicial para truchas: mezclar 50 g de alimento inicial para truchas (gránulos finos o polvo) y 300 ml de agua filtrada apropiada en una batidora durante 20 segundos
 2. Mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente): mezclar 12 g de discos del alga *Spirulina* y 500 ml de agua filtrada en una batidora durante 40 segundos; mezclar 12 g de TetraFin® (o equivalente) con 500 ml de agua filtrada y, a continuación, combinar estas mezclas para obtener un litro de suspensión de 12 g/l de algas *Spirulina* y 12 g/l de TetraFin® (o equivalente)
 3. Combinar volúmenes iguales de la mezcla de alimento inicial para truchas y de la mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente).

B. Artemia salina:

Se hacen eclosionar 15 ml de huevos de artemia salina en 1 l de agua salada (preparada añadiendo 20 ml de NaCl a 1 l de agua desionizada). Tras airear durante 24 horas a temperatura ambiente con iluminación constante, se recolectan las artemias salinas. Brevemente, durante 30 minutos se interrumpe la aireación para permitir que se depositen las artemias salinas. Los quistes que flotan en la parte superior del recipiente se vierten y se desechan, y las artemias se vierten a través de los filtros adecuados y se llevan a 30 ml con agua filtrada.

Protocolo de alimentación

En el cuadro 1 se indica el tipo y la cantidad de alimentos utilizados en las fases de exposición de las larvas. Los animales deben recibir alimentos tres veces al día de lunes a viernes y una vez al día en los fines de semana.

Cuadro 1: Régimen de alimentación para larvas de *X. laevis* en condiciones dinámicas

Tiempo*	Alimento inicial para truchas : algas/TetraFin® (o equivalente)	Artemia salina
---------	--	----------------

(tras la fertilización)	Día entre semana (tres veces al día)	Fin de semana (una vez al día)	Día entre semana (dos veces al día)	Fin de semana (una vez al día)
Días 4-14 (en las semanas 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (del día 8 al 15)	0,5 ml (del día 8 al 15)
Semana 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (a partir del día 16)	1 ml (a partir del día 16)
Semana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Semana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semanas 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* El día 0 se define como el día en que se efectúa la inyección de hCG.

Transición de la dieta para larvas a la dieta para juveniles

A medida que las larvas completan su metamorfosis, se les aplica la transición a una formulación de la dieta para juveniles que se explica a continuación. Mientras esta transición se está llevando a cabo, la dieta para larvas debe ir reduciéndose a medida que aumenta la alimentación de juveniles. Esto puede lograrse mediante una reducción proporcional de la alimentación de larvas, al tiempo que se incrementa proporcionalmente la alimentación de juveniles, cuando cada grupo de cinco renacuajos sobrepasa la fase NF 62 y se acerca a la terminación de la metamorfosis en la fase NF 66.

Alimentación de juveniles

Dieta para juveniles

Una vez que se haya completado la metamorfosis (fase 66), el régimen de alimentación se limita a alimento especial para ranas que sedimento, de primera calidad, de 3/32 pulgadas (Xenopus ExpressTM, FL, EE. UU.), o equivalente.

Preparación de los copos molidos de cara a la transición de larvas a juveniles

Los copos de alimento para ranas que sedimento se pasan brevemente por un molinillo de café, batidora o mortero, a fin de reducir el tamaño de los copos en aproximadamente 1/3. Si se prolonga el tratamiento, se obtiene polvo, lo que no es recomendable.

Protocolo de alimentación

En el **cuadro 2** se indica el tipo y la cantidad de alimentos utilizados en las fases de

juveniles y de adultos. Los animales deben recibir el alimento una vez al día. Cabe señalar que, cuando sufren la metamorfosis, los animales siguen recibiendo una porción de artemias salinas hasta que hayan completado la metamorfosis más del 95 % de los animales.

Los animales no deben recibir alimentos el día de la terminación del ensayo, para que el alimento no altere las mediciones del peso.

Cuadro 2: Régimen de alimentación para juveniles de *X. laevis* en condiciones dinámicas. Cabe señalar que los animales que no han sufrido la metamorfosis, incluidos aquellos cuya metamorfosis se ha retrasado por el tratamiento con el producto, no pueden comer copos sin moler.

Tiempo (semanas tras la fecha mediana de metamorfosis)	Cantidad de copos molidos (mg por rana joven)	Volumen de copos enteros (mg por rana joven)
Al completar los animales su metamorfosis	25	0
Semanas 0-1	25	28
Semanas 2-3	0	110
Semanas 4-5	0	165
Semanas 6-9	0	220

* El primer día de la semana 0 es la fecha mediana de la metamorfosis en los animales testigo.

Apéndice 5

DETERMINACIÓN DEL SEXO GENÉTICO

El método de determinación del sexo genético de *Xenopus laevis* se basa en Yoshimoto *et al.*, 2008. En esta publicación se pueden consultar, en caso necesario, procedimientos detallados para la determinación del genotipo sexual. Pueden utilizarse métodos alternativos (por ejemplo, la RCP cuantitativa de alto rendimiento) si se consideran adecuados.

Cebadores de *X. laevis*

Marcador de DM-W

Directo: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Inverso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Testigo positivo

Directo: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Inverso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificación del ADN

Se purifica el ADN del tejido muscular o cutáneo utilizando, por ejemplo, Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (n.º de catálogo 69506) o un producto similar, siguiendo las instrucciones del juego. El ADN puede eluirse a partir de las columnas de centrifugación, utilizando menos amortiguador a fin de obtener muestras más concentradas si se considera necesario para la RCP. Téngase en cuenta que el ADN es bastante estable, por lo que debe velarse por evitar la contaminación cruzada que pudiera dar lugar a una caracterización errónea de los machos como hembras, o viceversa.

RCP

En el **cuadro 1** se presenta un ejemplo de protocolo en el que se utiliza la polimerasa JumpStart™ *Taq* de Sigma.

Cuadro 1: Ejemplo de protocolo en el que se utiliza la polimerasa JumpStart™ *Taq* de Sigma.

Mezcla de reacción (<i>master mix</i>)	1x (µl)	[Final]
--	---------	---------

NFW (agua libre de nucleasas)	11	-
Amortiguador 10X	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM cada uno)	0,4	200 μM
Marcador de cebador directo (8 μM)	0,8	0,3 μM
Marcador de cebador inverso (8 μM)	0,8	0,3 μM
Testigo de cebador directo (8 μM)	0,8	0,3 μM
Testigo de cebador inverso (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unidades/μl
Molde de ADN	1,0	~ 200 pg/μl

Nota: Al preparar las mezclas de reacción, ha de prepararse más cantidad para compensar las eventuales pérdidas que puedan producirse durante el pipeteado (por ejemplo: debe utilizarse 25x para solo 24 reacciones).

Reacción:

Mezcla de reacción (<i>master mix</i>)	19,0 μl
Molde	1,0 μl
Total	<u>20,0 μl</u>

Perfil del termociclador:

Etapa 1.	94 °C	1 min
Etapa 2.	94 °C	30 s
Etapa 3.	60 °C	30 s
Etapa 4.	72 °C	1 min
Etapa 5.	Volver a la etapa 2.	35 ciclos
Etapa 6.	72 °C	1 min
Etapa 7.	4 °C	Mantener

Los productos de la RCP pueden someterse inmediatamente a electroforesis en gel o conservarse a 4 °C.

Electroforesis en gel de agarosa (3 %) (ejemplo de protocolo)*50X TAE*

Tris	24,2 g
Ácido acético glacial	5,71 ml
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g
Añadir agua hasta 100 ml	

1X TAE

H ₂ O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agarosa 3:1

3 partes de agarosa NuSieve™ GTG™

1 parte de agarosa de Fisher de baja electro-endósmosis (EEO)

Método

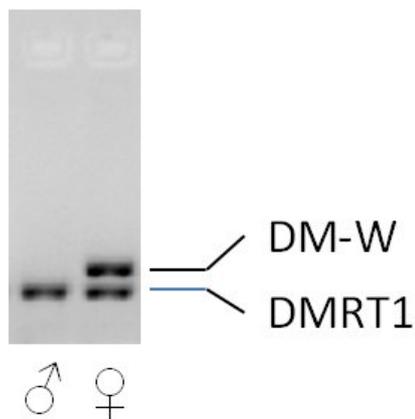
1. Preparar un gel del 3 % mediante adición de 1,2 g de mezcla de agarosa a 43 ml de 1X TAE. Agitar de forma circular para disociar los grandes grumos.
2. Poner en el horno de microondas la mezcla de agarosa hasta su completa disolución (evitar el desbordamiento por ebullición). Dejar enfriar ligeramente.
3. Añadir 1,0 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Agitar de forma circular el matraz. Téngase en cuenta que el bromuro de etidio es mutágeno, por lo que, en la medida en que sea técnicamente posible, deben utilizarse productos alternativos para reducir al mínimo los riesgos para la salud de los trabajadores¹.
4. Verter el gel en el molde con peine. Enfriar completamente.
5. Añadir gel al equipo. Cubrir el gel con 1X TAE.

¹ De acuerdo con el artículo 4, apartado 1, de la Directiva 2004/37/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes carcinógenos o mutágenos durante el trabajo (sexta Directiva específica con arreglo al artículo 16, apartado 1, de la Directiva 89/391/CEE del Consejo) (DO L 158 de 30.4.2004, p. 50).

6. Añadir 1 μ l de colorante de carga 6x a cada 10 μ l de producto de RCP.
7. Pipetear las muestras a los pocillos.
8. Dejar correr a 160 voltios constantes durante ~20 minutos.

En la **figura 1** se recoge una imagen de gel de agarosa en la que se muestra la distribución de las bandas que corresponden a machos y hembras.

Figura 1: Imagen del gel de agarosa que muestra la distribución de las bandas de un ejemplar macho (♂) (una sola banda a ~203 pb: DMRT1) y de un ejemplar hembra (♀) (dos bandas a ~259 pb: DM-W y 203 pb: DMRT1).



BIBLIOGRAFÍA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

Apéndice 6

MEDICIÓN DE LA VITELOGENINA

La medición de la vitelogenina (VTG) se realiza mediante un método de enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) que se desarrolló originalmente para la VTG del pez cabeza gorda (Parks *et al.*, 1999). Actualmente no existen anticuerpos disponibles en el comercio para *X. laevis*. Sin embargo, dada la riqueza de la información sobre esta proteína y la disponibilidad de servicios de producción de anticuerpos comerciales rentables, es razonable que los laboratorios puedan desarrollar fácilmente una prueba ELISA para hacer esta medición (Olstead *et al.*, 2009). También Olstead *et al.* (2009) aportan una descripción del ensayo modificada para la determinación de la VTG en *X. tropicalis*, tal como se indica a continuación. El método utiliza un anticuerpo preparado contra la VTG de *X. tropicalis*, pero del que se sabe que también funciona con la VTG de *X. laevis*. Cabe señalar que también pueden utilizarse métodos ELISA no competitivos, y que estos pueden tener unos límites de detección inferiores a los del método que se describe a continuación.

Materiales y reactivos

- Suero con el primer anticuerpo (Ab) preadsorbido

Mezclar una parte de suero con el primer Ab contra la VTG de *X. tropicalis* con dos partes de plasma de macho testigo y dejar a temperatura ambiente durante unos 75 minutos, poner en hielo durante 30 minutos, centrifugar > 20K x G durante 1 h a 4 °C, eliminar el sobrenadante, tomar una parte alícuota y conservar a -20 °C.

- Segundo anticuerpo

De cabra anti-Ig G de conejo, conjugado con HRP (p. ej., Bio-Rad 172-1019)

- Patrón de VTG

VTG de *X. laevis* purificada a 3,3 mg/ml

- TMB (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina) (p. ej., KPL 50-76-00, o Sigma T0440)
- Suero de cabra normal (NGS, *normal goat serum*) (p. ej., Chemicon® S26-100 ml)
- Placas de microvaloración de poliestireno EIA de 96 pocillos (por ejemplo, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- Estufa de hibridación (o incubadora de aire de equilibrio rápido) a 37 °C, para placas, baño de agua para tubos
- Otros equipos, productos y suministros de laboratorio comunes.

Composiciones

Solución amortiguadora de recubrimiento (solución amortiguadora de carbonato 50 mM,

pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
Agua	428 ml

10X PBS (fosfato 0,1 M, NaCl 1,5 M):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
Agua	810 ml

Solución amortiguadora de lavado (PBST):

10X PBS	100 ml
Agua	900 ml

Ajustar el pH a 7,3 con HCl 1 M; añadir a continuación 0,5 ml de Tween-20.

Solución amortiguadora de ensayo:

Suero de cabra normal (NGS)	3,75 ml
Solución amortiguadora de lavado	146,25 ml

Recogida de muestras

Se recoge sangre con un tubo de microhematocrito heparinizado y se coloca en hielo. Tras centrifugar durante 3 minutos, se asigna la puntuación al tubo, que se abre a continuación y el plasma se pasa a tubos de microcentrifugación de 0,6 ml que contienen 0,13 unidades de aprotinina liofilizada. (Estos tubos se preparan con antelación añadiendo la cantidad adecuada de aprotinina, congelándolos y liofilizándolos en vacío a baja temperatura hasta su desecación.) Se conserva el plasma a -80 °C hasta que se analice.

Procedimiento para una placa

Recubrimiento de la placa

Mezclar 20 µl de VTG purificada con 22 ml de solución amortiguadora de carbonato (concentración final de 3 µg/ml). Añadir 200 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Tapar la placa con una película de sellado adhesiva y dejar incubando a 37 °C durante 2 horas (o a 4 °C hasta el día siguiente).

Bloqueo de la placa

La solución de bloqueo se prepara añadiendo 2 ml de suero de cabra normal (NGS) a 38 ml de solución amortiguadora de carbonato. Retirar la solución de recubrimiento y sacudir para secar. Añadir a cada pocillo 350 µl de la solución de bloqueo. Tapar la placa con una película de sellado adhesiva y dejar incubando a 37 °C durante 2 horas (o a 4 °C hasta el día siguiente).

Preparación de los patrones

Se mezclan 5,8 µl de patrón de VTG purificada con 1,5 ml de solución amortiguadora de ensayo en un tubo de ensayo desechable de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm. Se obtiene así una concentración de 12 760 ng/ml. A continuación se lleva a cabo una serie de diluciones añadiendo 750 µl de la dilución anterior a 750 µl de la solución amortiguadora de ensayo para obtener las concentraciones finales de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 y 50 ng/ml.

Preparación de las muestras

Empezar con una dilución de plasma en solución amortiguadora de ensayo 1 : 300 (por ejemplo, combinar 1 µl de plasma con 299 µl de solución amortiguadora de ensayo) o 1 : 30. Si se espera una cantidad importante de VTG, puede ser necesario utilizar diluciones adicionales o mayores. Ha de procurarse mantener B/B₀ en el intervalo de los patrones. Para las muestras sin VTG apreciable como, p. ej., machos y hembras testigo (todos los cuales son inmaduros), se debe utilizar la dilución 1 : 30. Las muestras con una dilución menor que esta pueden mostrar efectos matriciales no deseados.

Además, se recomienda estudiar una muestra de un testigo positivo en cada placa. Esta muestra procede de una mezcla de plasma que contiene altos niveles inducidos de VTG. La mezcla se diluye inicialmente en NGS, se divide en partes alícuotas y se conserva a -80 °C. Por cada placa, una parte alícuota se descongela, se diluye más en solución amortiguadora de ensayo y se somete a ensayo de forma similar a una muestra problema.

Incubación con el primer anticuerpo

El primer Ab se prepara haciendo una dilución de 1 : 2 000 del suero con el primer Ab preadsorbido en solución amortiguadora de ensayo (p. ej., 8 µl en 16 ml de solución amortiguadora de ensayo). Se combinan 300 µl de la solución del primer Ab con 300 µl de muestra/patrón en un tubo de vidrio. El tubo B₀ se prepara de forma similar con 300 µl de solución amortiguadora de ensayo y 300 µl de anticuerpo. También debe prepararse un tubo de NSB utilizando solo 600 µl de solución amortiguadora de ensayo, es decir, sin Ab. Se cubren los tubos con Parafilm y se agitan suavemente en vórtex para mezclar. Se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora.

Lavado de la placa

Justo antes de que se complete la incubación del primer Ab, se lava la placa. Esto se lleva a cabo sacudiendo la placa para expulsar su contenido y secando con papel absorbente. A continuación, se llenan los pocillos con 350 μ l de solución de lavado, que se retira después, y se seca con papel absorbente. En este contexto es útil contar con un lavador de placas o una pipeta de repetición multicanal. La fase de lavado se repite dos veces más para efectuar un total de tres lavados.

Carga de la placa

Después de haber lavado la placa, se retiran los tubos del baño de agua y se agitan en vórtex ligeramente. Se añaden 200 μ l de cada muestra, patrón, B_0 , y del tubo de NSB, a dos pocillos de la placa. Se tapa la placa con una película de sellado adhesiva y se deja incubando a 37 °C durante 1 hora.

Incubación con el segundo anticuerpo

Al final de la incubación de la etapa anterior, la placa debe lavarse tres veces de nuevo, como se indica más arriba. El segundo Ab diluido se prepara mezclando 2,5 μ l del segundo Ab con 50 ml de solución amortiguadora de ensayo. Se añaden 200 μ l del segundo Ab diluido a cada pocillo, se sella como se indica más arriba, y se incuba durante 1 hora a 37 °C.

Adición de sustrato

Una vez finalizada la incubación con el segundo Ab, se lava la placa tres veces como se ha descrito anteriormente. Se añaden a continuación a cada pocillo 100 μ l de sustrato de TMB. Se dejan pasar 10 minutos para que se realice la reacción, preferiblemente protegida de la luz intensa. Se interrumpe la reacción añadiendo 100 μ l de ácido fosfórico 1 M. De esta manera cambiará el color de azul a amarillo intenso. Se mide la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas.

Cálculo de B/B₀

Se resta el valor medio de NSB de todas las mediciones. El valor de B/ B_0 correspondiente a cada muestra y patrón se calcula dividiendo el valor de la absorbancia (B) por la absorbancia media de la muestra B_0 .

Obtención de la curva patrón y determinación de las cantidades desconocidas

Se genera una curva patrón con ayuda de algún programa informático de trazado de gráficas (por ejemplo, Slidewrite™ o Sigma Plot®) que extrapole las cantidades a partir del valor de B/ B_0 de las muestras sobre la base del valor de B/ B_0 de los patrones. Normalmente, la cantidad se representa a escala logarítmica y la curva tiene forma sigmoidea. Sin embargo, puede tener aspecto lineal si se utiliza un intervalo limitado de patrones. Se corrigen las

cantidades de las muestras para tener en cuenta el factor de dilución y se consignan como mg de VTG/ml de plasma.

Determinación de los límites mínimos de detección (LMD)

A menudo, especialmente en relación con machos normales, no está claro cómo consignar los resultados de los valores bajos. En estos casos, deben utilizarse los “límites de confianza” del 95 % para determinar si el valor debe consignarse como cero o como algún otro número. Si el resultado de la muestra se encuentra dentro del intervalo de confianza del patrón cero (B_0), el resultado debe consignarse como cero. El nivel mínimo de detección será el del patrón más bajo que sea sistemáticamente diferente del del patrón cero; es decir, los dos intervalos de confianza no se han de solapar. Para cualquier resultado de una muestra que esté dentro del límite de confianza del nivel mínimo de detección, o por encima, se consignará el valor calculado. Si una muestra se sitúa entre el intervalo de confianza del patrón cero y el del nivel mínimo de detección, se consignará la mitad del nivel mínimo de detección como valor de dicha muestra.

BIBLIOGRAFÍA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

Apéndice 7

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El LAGDA genera tres tipos de datos que se han de analizar estadísticamente: 1) datos cuantitativos continuos, 2) datos de tiempo hasta un evento en cuanto a las tasas de desarrollo (tiempo hasta la fase NF 62) y 3) datos ordinales en forma de puntuaciones de gravedad o fases de desarrollo a partir de las evaluaciones de histopatología. En la figura 1 se muestra el árbol de decisiones de análisis estadísticos recomendado para el LAGDA. Asimismo, a continuación se indican algunas notas que podrían ser necesarias para realizar un análisis estadístico de las mediciones del LAGDA. Respecto al árbol de decisiones de análisis, los resultados de las mediciones de la mortalidad, el crecimiento (peso y longitud) y el índice hepatosomático (IHS) deben analizarse con arreglo a la rama “Otros parámetros”.

Datos continuos

En primer lugar, debe comprobarse la monotonidad de los datos de los parámetros continuos, mediante la transformación por rangos de los datos, el ajuste a un modelo de ANOVA y la comparación de contrastes lineales y cuadráticos. Si los datos son monótonos, debe realizarse una prueba de tendencia de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra con las medianas de las réplicas y no deben aplicarse análisis posteriores. Una alternativa para los datos que se distribuyen normalmente con varianzas homogéneas es la prueba de ajuste secuencial de Williams. Si los datos no son monótonos (el contraste cuadrático es significativo y el lineal no lo es), deben analizarse utilizando un modelo de ANOVA de efectos mixtos. A continuación se deben evaluar los datos en cuanto a su normalidad (utilizando preferentemente la prueba de Shapiro-Wilk o Anderson-Darling) y a la homogeneidad de la varianza (preferentemente con la prueba de Levene). Ambas pruebas se realizan con los valores residuales del modelo de ANOVA de efectos mixtos. Se pueden utilizar juicios de expertos en lugar de estas pruebas formales para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza, aunque se prefieren las pruebas formales. Si los datos se distribuyen normalmente con varianza homogénea, se cumplen las hipótesis de un ANOVA de efectos mixtos y se determina un efecto significativo del tratamiento a partir de la prueba de Dunnett. En caso de que se compruebe la ausencia de normalidad o la heterogeneidad de la varianza, se infringen las hipótesis de la prueba de Dunnett y se busca una transformación de normalización y de estabilización de la varianza. Si no se encuentra tal transformación, se determinará un efecto del tratamiento significativo con una prueba de Dunn. Siempre que sea posible, debe realizarse una prueba unilateral, a diferencia de una prueba bilateral, pero requiere que un juicio de expertos determine cuál es la apropiada para un parámetro dado.

Mortalidad

Deben analizarse los datos de mortalidad en relación con el período que abarque todo el ensayo y expresarse como proporción de animales muertos en un recipiente concreto. Los renacuajos que no completen la metamorfosis en el tiempo establecido, los renacuajos

contenidos en la cohorte de la submuestra de larvas, las ranas juveniles objeto de sacrificio parcial y los eventuales animales que mueran por error del experimentador deben tratarse como datos censurados y no incluirse en el denominador del cálculo del porcentaje. Con anterioridad a cualquier análisis estadístico, las proporciones de mortalidad deben ser objeto de una transformación arcoseno de raíz cuadrada. Una alternativa es utilizar la prueba de ajuste secuencial de Cochran-Armitage, posiblemente con un ajuste de Rao-Scott si hay dispersión excesiva.

Peso y longitud (datos de crecimiento)

Los machos y las hembras no son sexualmente dimorfos durante la metamorfosis, por lo que los datos sobre el crecimiento de la submuestra de larvas se deben analizar con independencia del sexo. No obstante, los datos relativos al crecimiento de los juveniles deben analizarse por separado en función del sexo genético. Puede ser necesario llevar a cabo una transformación logarítmica en relación con estos parámetros, ya que no es infrecuente la distribución logarítmica normal de los datos sobre el tamaño.

Índice hepatosomático (IHS)

El peso del hígado debe normalizarse como proporción del peso corporal entero (es decir, IHS) y analizarse por separado en función del sexo genético.

Tiempo hasta la fase NF 62

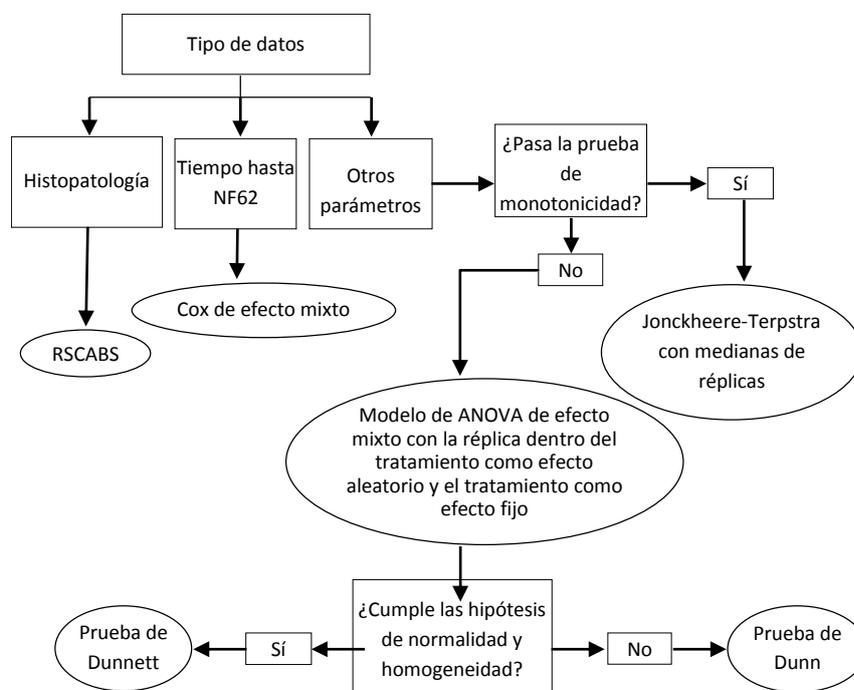
Los datos sobre el tiempo hasta la metamorfosis deben tratarse como datos de tiempo hasta un evento, y los eventuales datos sobre mortalidad o individuos que no alcanzan la fase NF 62 en 70 días se tratan como datos censurados por la derecha (es decir, el valor real es superior a 70 días, pero el estudio finaliza antes de que los animales hayan alcanzado la fase NF 62 en 70 días). La mediana del tiempo hasta la fase NF 62 de finalización de la metamorfosis en los testigos del agua de dilución debe utilizarse para determinar la fecha de terminación del ensayo. La mediana del tiempo hasta la finalización de la metamorfosis podría determinarse mediante los estimadores de producto límite de Kaplan-Meier. Este parámetro debe analizarse utilizando un modelo de peligro proporcional de Cox de efecto mixto que tenga en cuenta la estructura de réplicas del estudio.

Datos de histopatología (puntuaciones de la gravedad y fases de desarrollo)

Los datos de histopatología tienen forma de puntuaciones de la gravedad o de fases de desarrollo. Un ensayo denominado RSCABS (*Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*, modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes) utiliza una prueba de tendencia de Cochran-Armitage con un ajuste de Rao-Scott a cada nivel de gravedad en una respuesta de histopatología (Green *et al.*, 2014). El ajuste de Rao-Scott incorpora al ensayo el diseño experimental de los recipientes replicados. El procedimiento “por cortes” incorpora las expectativas biológicas de que la gravedad del efecto tiende a aumentar con el aumento de las dosis o las concentraciones, manteniendo al mismo tiempo las puntuaciones individuales y revelando la gravedad de los posibles efectos observados. El procedimiento

RSCABS no solo determina qué tratamientos son estadísticamente diferentes de los testigos (es decir, tienen una histopatología más grave que los testigos), sino que también determina con qué puntuación de la gravedad se produce la diferencia, proporcionando así un contexto muy necesario para el análisis. En el caso de la determinación de las fases de desarrollo de las gónadas y los conductos genitales, debe aplicarse una manipulación adicional a los datos, ya que la hipótesis de la RSCABS consiste en que la gravedad del efecto aumenta con la dosis. El efecto observado podría ser un retraso o una aceleración del desarrollo. Por lo tanto, los datos sobre las fases de desarrollo deben analizarse tal como se hayan consignado a fin de detectar una eventual aceleración en el desarrollo y, a continuación, deben invertirse manualmente antes de un segundo análisis para detectar un eventual retraso en el desarrollo.

Figura 1: Árbol de decisiones de análisis estadísticos para los datos del LAGDA.



BIBLIOGRAFÍA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Apéndice 8

CONSIDERACIONES SOBRE EL SEGUIMIENTO Y LA REDUCCIÓN AL MÍNIMO DE LA INCIDENCIA DE LA ESCOLIOSIS

La escoliosis idiopática, generalmente manifestada como “cola torcida” en los renacuajos de *Xenopus laevis*, puede complicar las observaciones morfológicas y comportamentales de las poblaciones sometidas a ensayo. Debe intentarse minimizar o eliminar la incidencia de la escoliosis, tanto en las poblaciones iniciales como en las condiciones de ensayo. En el ensayo definitivo, se recomienda que la prevalencia de la escoliosis moderada y grave sea inferior al 10 %, con el fin de aumentar la confianza en que el ensayo pueda detectar efectos sobre el desarrollo relacionados con el tratamiento en larvas de anfibios que por lo demás estén sanas.

Las observaciones diarias durante el ensayo definitivo deben registrar tanto la incidencia (recuento de animales) como la gravedad de la escoliosis, cuando se dé esta. La naturaleza de la anomalía debe describirse con respecto a la ubicación (p. ej., anterior o posterior a la cloaca) y a la dirección de la curvatura (p. ej., lateral o dorsal a ventral). La gravedad puede clasificarse del siguiente modo:

(NR) No relevante: no se observa ninguna curvatura;

(1) Mínima: ligera curvatura lateral, posterior a la cloaca; visible solo en reposo;

(2) Moderada: curvatura lateral, posterior a la cloaca; es visible en todo momento pero no inhibe el movimiento;

(3) Grave: curvatura lateral, anterior a la cloaca; O cualquier curvatura que inhiba el movimiento; O cualquier curvatura dorsal a ventral.

Un Grupo Consultivo Científico (SAP, *Scientific Advisory Panel*) de la FIFRA de la EPA de EE.UU. (FIFRA SAP 2013) revisó los datos resumidos relativos a la escoliosis en quince ensayos de metamorfosis de anfibios con *X. laevis* (fase NF de 51 a 60+) y ofreció recomendaciones generales para reducir la prevalencia de esta anomalía en las poblaciones sometidas a ensayo. Las recomendaciones son pertinentes para el LAGDA, aunque este ensayo abarca un tiempo de desarrollo más largo.

Comportamiento histórico en cuanto al desove

Por lo general, deben usarse como parejas reproductoras adultos de alta calidad y sanos; la eliminación de las parejas de cría que producen descendientes con escoliosis puede reducir al mínimo su incidencia a lo largo del tiempo. En concreto, puede ser beneficiosa la minimización del uso de animales reproductores capturados en el medio silvestre. El período de exposición del LAGDA comienza con embriones en la fase NF 8-10, y no es

factible determinar al principio del ensayo si los individuos concretos van a presentar escoliosis. Así pues, además de hacer un seguimiento de la incidencia de la escoliosis en los animales que se someten al ensayo, debe documentarse el comportamiento histórico de la nidada de animales (incluida la prevalencia de la escoliosis en las larvas a las que se permita desarrollarse). Puede ser útil seguir realizando un seguimiento de la parte de cada nidada que no se utilice en un determinado estudio y consignar estas observaciones (FIFRA SAP 2013).

Calidad del agua

Es importante garantizar una calidad adecuada del agua, tanto en relación con la población de laboratorio como durante el ensayo. Además de los criterios de calidad del agua que se evalúan sistemáticamente en los ensayos de toxicidad acuática, puede ser útil supervisar y corregir las eventuales deficiencias de nutrientes (como, por ejemplo, deficiencia de vitamina C, calcio, fósforo) o los niveles excesivos de selenio y cobre, de los que se dice que provocan escoliosis en diversos grados en especímenes de *Rana* sp. y *Xenopus* sp. criados en laboratorio (Marshall *et al.*, 1980; Leibovitz *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1992; tal y como se recoge en FIFRA SAP 2013). En general, el uso de un régimen alimentario adecuado (véase el apéndice 4) y la limpieza periódica de los recipientes mejoran la calidad del agua y la salud de los ejemplares sometidos al ensayo.

Alimentación

En el apéndice 4 se detallan las recomendaciones específicas sobre el régimen alimentario, de las que se ha comprobado que tienen éxito en el LAGDA. Se recomienda que se controlen las fuentes de alimentación en cuanto a la presencia de toxinas biológicas, herbicidas y otros plaguicidas de los que se sepa que causan escoliosis en *X. laevis* o en otros animales acuáticos (Schlenk y Jenkins, 2013). Por ejemplo, la exposición a determinados inhibidores de la colinesterasa se ha asociado con la escoliosis en peces (Schultz *et al.*, 1985) y ranas (Bacchetta *et al.*, 2008).

BIBLIOGRAFÍA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martínez, I., R. Álvarez, I. Herráez, and P. Herráez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. ».