

II

(Actos no legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) Nº 900/2014 DE LA COMISIÓN

de 15 de julio de 2014

que modifica, con vistas a su adaptación al progreso técnico, el Reglamento (CE) nº 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 13, apartado 2,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión ⁽²⁾ incluye los métodos de ensayo para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de las sustancias, que deben aplicarse a efectos del Reglamento (CE) nº 1907/2006.
- (2) Es necesario actualizar el Reglamento (CE) nº 440/2008 a fin de incluir con carácter prioritario los métodos de ensayo nuevos y actualizados adoptados recientemente por la OCDE para tener en cuenta el progreso técnico y para reducir el número de animales utilizados con fines experimentales, de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽³⁾. Se ha consultado a los interesados sobre el presente proyecto.
- (3) Esta adaptación al progreso técnico contiene seis nuevos métodos de ensayo para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud, incluido un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo, un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación, un ensayo de mutación génica *in vivo* con roedores transgénicos, un ensayo *in vitro* para evaluar los efectos sobre la síntesis de las hormonas esteroideas, así como dos métodos *in vivo* para evaluar los efectos estrogénicos y (anti)androgénicos.
- (4) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) nº 440/2008 en consecuencia.
- (5) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité creado en virtud del artículo 133 del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

⁽¹⁾ DO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) (DO L 142 de 31.5.2008, p. 1).

⁽³⁾ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CE) n° 440/2008 queda modificado de acuerdo con el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

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

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 15 de julio de 2014.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO

El anexo del Reglamento (CE) nº 440/2008 queda modificado como sigue:

Se introducen los capítulos B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 y B.58:

«B.53. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD PARA EL DESARROLLO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 426 (2007). En Copenhague, en junio de 1995, un grupo de trabajo de la OCDE sobre toxicidad para la reproducción y el desarrollo debatió la necesidad de actualizar las vigentes directrices de ensayo de la OCDE sobre la toxicidad para la reproducción y el desarrollo, así como de elaborar nuevas directrices sobre parámetros aún no incluidos (1). El grupo de trabajo recomendó que se escribieran unas directrices de ensayo sobre la neurotoxicidad para el desarrollo, sobre la base de unas directrices de la Agencia de Protección del Medio Ambiente estadounidense (EPA), que después han sido revisadas (2). En junio de 1996 se celebró en Copenhague una segunda reunión de consulta para facilitar a la Secretaría orientaciones para el esbozo de unas nuevas directrices de ensayo sobre la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los principales elementos como, por ejemplo, los datos sobre la elección de la especie animal, el período de administración, el período de las pruebas, los parámetros que deben evaluarse, y los criterios para la evaluación de los resultados. En 1998 se publicaron unas directrices de evaluación del riesgo de neurotoxicidad de EE. UU. (3). En octubre de 2000 se celebraron consecutivamente una reunión de consulta de expertos de la OCDE y un taller del Instituto de Ciencias del Riesgo del ILSI, y en 2005 tuvo lugar en Tokio una reunión de consulta de expertos. Estas reuniones se celebraron para debatir las cuestiones científicas y técnicas relacionadas con las vigentes directrices de ensayo, y en ellas se elaboraron recomendaciones (4)(5)(6)(7) que se tuvieron en cuenta para desarrollar el presente método de ensayo. En los documentos de orientación de la OCDE nº 43 sobre "Reproductive Toxicity Testing and Assessment" (Ensayo y evaluación de la toxicidad para la reproducción) (8) y nº 20 sobre "Neurotoxicity Testing" (Ensayo de la neurotoxicidad) (9) se encuentra información adicional sobre la realización, interpretación y terminología correspondientes al presente método de ensayo.

CONSIDERACIONES INICIALES

2. Se sabe que una serie de sustancias produce efectos neurotóxicos en el desarrollo de los seres humanos y de otras especies (10)(11)(12)(13). Con el fin de valorar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser necesario determinar su posible neurotoxicidad para el desarrollo. Se han diseñado estudios de neurotoxicidad para el desarrollo con el fin de ofrecer datos, incluida la caracterización de la relación dosis-respuesta, en relación con los posibles efectos funcionales y morfológicos sobre el sistema nervioso en desarrollo de la descendencia que puedan derivarse de la exposición durante la gestación y durante las primeras fases de la vida.
3. El estudio de la neurotoxicidad para el desarrollo puede llevarse a cabo como estudio aparte, incorporarse en un estudio de la toxicidad para la reproducción o de la neurotoxicidad para los adultos [por ejemplo, métodos de ensayo B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], o añadirse a un estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal [por ejemplo, método de ensayo B.31 (17)]. Cuando el estudio de neurotoxicidad para el desarrollo está incorporado o añadido a otro estudio, es imperativo preservar la integridad de los dos tipos de estudios. Todos los ensayos deben cumplir la legislación aplicable o las directrices gubernamentales o institucionales para el uso de animales de laboratorio en la investigación (por ejemplo, 18).
4. Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura de la sustancia, sus propiedades físico-químicas, los resultados de otros eventuales ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuados con ella, los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los interesados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana, y ayudará a la selección de una dosis inicial adecuada.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

5. La sustancia problema se administra a los animales durante la gestación y lactancia. Se someten a ensayo animales madres para evaluar los efectos en las hembras gestantes y lactantes y también para obtener información comparativa (madres/descendientes). Se seleccionan aleatoriamente descendientes dentro de las camadas para realizar la evaluación de la neurotoxicidad. Esta evaluación consiste en realizar observaciones para detectar anomalías conductuales y neurológicas macroscópicas, incluida la evaluación del desarrollo físico, la ontogenia del comportamiento, la actividad motriz, las funciones motrices y sensitivas, y el aprendizaje y la memoria, así como la evaluación del peso del encéfalo y de la neuropatología durante el período de desarrollo postnatal y la edad adulta.

6. Cuando el método de ensayo se lleva a cabo como estudio aparte, pueden utilizarse animales disponibles adicionales de cada grupo para aplicarles procedimientos específicos neuroconductuales, neuropatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos, con el fin de completar los datos obtenidos a partir de los exámenes recomendados por este método de ensayo (16)(19)(20)(21). Los procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando la observación empírica, los efectos previstos o el mecanismo o modo de acción indiquen un tipo determinado de neurotoxicidad. Estos procedimientos complementarios pueden utilizarse con las madres y también con las crías. Además, pueden utilizarse también procedimientos *ex vivo* o *in vitro*, en la medida en que dichos procedimientos no alteren la integridad de los procedimientos *in vivo*.

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. La especie de ensayo preferida es la rata, pero pueden utilizarse otras especies cuando sea pertinente. Téngase en cuenta, no obstante, que los días de gestación y postnatales especificados en este método de ensayo son específicos de las cepas de ratas utilizadas habitualmente, y deben seleccionarse días comparables si se utiliza una especie diferente o una cepa poco usual. La utilización de otra especie debe justificarse con datos toxicológicos, farmacocinéticos o de otro tipo. La justificación debe incluir la disponibilidad de evaluaciones neuroconductuales y neuropatológicas postnatales propias de la especie. Si existe un ensayo anterior que haya suscitado inquietud, debe considerarse utilizar la especie o cepa que haya suscitado tal inquietud. Debido a las diferencias de comportamiento que presentan las diferentes cepas de rata, debe demostrarse que la cepa seleccionada para su uso presenta una fecundidad y una capacidad de respuesta adecuadas. Deben estar documentadas la fiabilidad y la sensibilidad de otras especies para detectar la neurotoxicidad para el desarrollo.

Condiciones de alojamiento y alimentación

8. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente sin superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. También es posible invertir el ciclo de luz antes del apareamiento y en toda la duración del estudio, a fin de efectuar las evaluaciones de los parámetros funcionales y de comportamiento durante el período de oscuridad (con luz roja), es decir, durante el tiempo en que los animales están normalmente activos (22). Los eventuales cambios en el ciclo de luz-oscuridad deben incluir un tiempo adecuado de aclimatación para que los animales puedan adaptarse al nuevo ciclo. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. Los tipos de alimentos y de agua deben notificarse y ambos elementos deben analizarse para la detección de eventuales contaminantes.
9. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobado el apareamiento o como tarde el día 15 de la gestación, los animales que se hayan apareado deben colocarse por separado en jaulas preparadas para el parto y la maternidad. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Cuando se acerque la fecha del parto, a las hembras apareadas se les proporcionará material adecuado y determinado de nidificación. Se sabe que el estrés o la manipulación indebida durante la gestación pueden ocasionar resultados adversos, como muerte fetal y alteraciones del desarrollo fetal y postnatal. Para prevenir las muertes fetales debidas a factores ajenos al tratamiento, los animales deben tratarse con precaución durante la gestación, y debe evitarse el estrés debido a factores externos como el ruido excesivo.

Preparación de los animales

10. Deben emplearse animales sanos, que estén aclimatados a las condiciones del laboratorio y que no se hayan sometido a experimentos previos, a menos que el estudio esté incorporado a otro estudio (véase el punto 3). Deben caracterizarse los animales de experimentación en cuanto a su especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad. A cada animal se le debe asignar un número de identificación único, con el que estará marcado. Los animales de todos los grupos de ensayo han de ser tan homogéneos como resulte posible en cuanto a su peso y edad, y deben estar en el intervalo normal de la especie y cepa en estudio. Deben emplearse hembras adultas jóvenes y nulíparas para cada dosis. Los hermanos no deben aparearse, y debe prestarse atención para garantizar este extremo. El día de gestación (DG) 0 es el día en el que se observa la presencia de un tapón vaginal o de semen. Debe dejarse un tiempo adecuado de aclimatación (por ejemplo, de 2 o 3 días), al comprar a un proveedor animales con un tiempo conocido de gestación. Las hembras apareadas se deben repartir sin sesgos entre los grupos tratados y los de control, y en la medida de lo posible deben distribuirse de manera equilibrada entre los grupos (por ejemplo, se recomienda un procedimiento aleatorio estratificado para conseguir una distribución equilibrada entre todos los grupos, tal como el basado en el peso corporal). Las hembras inseminadas por un mismo macho deben repartirse de forma igualitaria entre los grupos.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

11. Cada grupo tratado y de control debe incluir un número suficiente de hembras grávidas que se expondrán a la sustancia problema a fin de conseguir un número adecuado de descendientes para la evaluación de la neurotoxicidad. Se recomienda un total de 20 camadas para cada nivel de dosis. Se permiten diseños de la administración en grupos duplicados y en grupos escalonados siempre que se consiga el número total de camadas por grupo y se utilicen modelos estadísticos adecuados para tener en cuenta las duplicaciones.
12. En el día postnatal (DPN) 4 (el DPN 0 es el del parto) o antes del mismo, se debe ajustar el tamaño de cada camada mediante la eliminación de las crías sobrantes por selección aleatoria para obtener un tamaño uniforme de todas las camadas (23). El tamaño de la camada no debe superar el tamaño medio de las camadas de la cepa de roedores utilizados (8-12). Las camadas deben tener, en la medida de lo posible, un número igual de crías machos y hembras. No es apropiada la eliminación selectiva de las crías, por ejemplo en función del peso corporal. Tras la normalización de las camadas (sacrificio de las crías sobrantes) y antes de realizar las pruebas de los parámetros funcionales, las crías concretas que se asignen a los ensayos anteriores o posteriores al destete deben identificarse de manera inequívoca, utilizando cualquier método no cruel adecuado a tal fin (por ejemplo, 24).

Asignación de los animales a los ensayos funcionales y de comportamiento, pesajes del encéfalo y evaluaciones neuropatológicas

13. El método de ensayo permite diferentes enfoques con respecto a la asignación de animales expuestos en el útero y a través de la lactancia a ensayos funcionales y de comportamiento, determinación de la maduración sexual, pesaje del encéfalo, y evaluación neuropatológica (25). Se pueden añadir otros ensayos de la función neuroconductual (por ejemplo, el comportamiento social), de neuroquímica o de neuropatología según cada caso, siempre que no se vea comprometida la integridad de los ensayos originales requeridos.
14. Se seleccionan las crías de cada grupo de dosis y se asignan para la evaluación de los parámetros el DPN 4 o después. Deben seleccionarse las crías de tal modo que, en la medida de lo posible, estén representados igualmente en todas las pruebas los dos sexos de cada camada en cada grupo de dosis. Para el ensayo de la actividad motriz, debe someterse a ensayo el mismo par de crías machos y hembras a todas las edades antes del destete (véase el punto 35). Para todos los demás ensayos, es posible asignar a las diferentes pruebas de comportamiento el mismo par de animales machos y hembras u otros distintos. Puede ser necesario asignar crías diferentes a los ensayos de la función cognitiva de animales destetados frente a los de animales adultos con el fin de evitar la confusión entre los efectos de la edad y los del entrenamiento previo sobre estas mediciones (26)(27). En el momento del destete (DPN 21), las crías que no se hayan seleccionado para algún ensayo pueden desecharse de forma compasiva. Todas las eventuales alteraciones de las asignaciones de las crías deben recogerse en el informe. La unidad estadística de medida debe ser la camada (o la madre) y no la cría.
15. Existen diversas maneras de asignar las crías a los exámenes anteriores y posteriores al destete, ensayos cognitivos, exámenes patológicos, etc. (véase la figura 1 en cuanto al diseño general y el apéndice 1 en cuanto a ejemplos de asignación). Los números mínimos recomendados de animales en cada grupo tratado para los exámenes anteriores y posteriores al destete son los siguientes:

Observaciones clínicas y de peso corporal	Todos los animales
Observaciones clínicas detalladas	20/sexo (1/sexo/camada)
Peso del encéfalo (tras la fijación) DPN 11-22	10/sexo (1/camada)
Peso del encéfalo (sin fijar) ~ DPN 70	10/sexo (1/camada)
Neuropatología (fijación por inmersión o perfusión) DPN 11-22	10/sexo (1/camada)
Neuropatología (fijación por perfusión) ~ DPN 70	10/sexo (1/camada)

Maduración sexual	20/sexo (1/sexo/camada)
Otros parámetros del desarrollo (optativos)	Todos los animales
Ontogenia del comportamiento	20/sexo (1/sexo/camada)
Actividad motriz	20/sexo (1/sexo/camada)
Funciones motrices y sensitivas	20/sexo (1/sexo/camada)
Aprendizaje y memoria	10/sexo ^(a) (1/camada)

^(a) Dependiendo de la sensibilidad de los ensayos de la función cognitiva, debe considerarse a veces la investigación de un número mucho más elevado de animales, por ejemplo, hasta 1 macho y 1 hembra por camada (sobre las asignaciones de animales, véase el apéndice 1) [se encuentra más información sobre el tamaño de la muestra en el documento de orientación de la OCDE 43 (8)].

Posología

16. Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un grupo de control en paralelo. Las dosis han de ser espaciadas para obtener una gradación de efectos tóxicos. Salvo cuando esté limitada por la naturaleza fisicoquímica o las propiedades biológicas de la sustancia, la dosis más elevada debe elegirse de forma que induzca cierta toxicidad para la madre (por ejemplo, signos clínicos, descenso del aumento de peso corporal (en no más del 10 %), o pruebas de toxicidad limitante de la dosis en un órgano diana). La dosis más alta puede limitarse a 1 000 mg/kg/día de peso corporal, con algunas excepciones; por ejemplo, la exposición humana prevista puede indicar la necesidad de utilizar una dosis superior. Otra posibilidad consiste en realizar estudios piloto o estudios preliminares para determinar el intervalo de concentraciones, a fin de establecer la dosis máxima utilizable que debe producir un grado mínimo de toxicidad para la madre. Si se ha comprobado que la sustancia problema es tóxica para el desarrollo, ya sea en un estudio normal de toxicidad para el desarrollo o en un estudio piloto, la dosis más alta debe ser la dosis máxima que no induce toxicidad excesiva para los descendientes ni muerte fetal o neonatal ni malformaciones, lo que sería suficiente para no permitir una evaluación significativa de la neurotoxicidad. La dosis más baja debe aspirar a no provocar ningún signo de toxicidad para la madre ni para el desarrollo, incluida la neurotoxicidad. Debe seleccionarse una secuencia decreciente de dosis con vistas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la existencia de un nivel sin efectos adversos observados (NOAEL), o dosis cerca del límite de detección que permitan la determinación de una dosis de referencia. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis.
17. Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad y la información complementaria relativa al metabolismo y la toxicocinética de la sustancia problema o productos afines. Dicha información puede ayudar asimismo a justificar la pertinencia de la posología. Debe considerarse la administración directa de dosis a las crías en función de la información sobre la exposición y la farmacocinética (28)(29). Antes de realizar estudios de administración directa de dosis deben considerarse cuidadosamente sus ventajas e inconvenientes (30).
18. El grupo de control en paralelo debe ser un grupo de control que no recibe tratamiento, o un grupo de control del vehículo si se utiliza este para administrar la sustancia problema. En principio, todos los animales deben recibir el mismo volumen de sustancia problema o de vehículo por unidad de peso corporal. Si se utiliza un vehículo u otro aditivo para facilitar la administración, debe atenderse a las siguientes características: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema; efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia problema que puedan modificar sus características de toxicidad; y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales. El vehículo no debe provocar efectos que puedan interferir con la interpretación del estudio y tampoco debe ser tóxico neuroconductual ni afectar a la reproducción o al desarrollo. En caso de nuevos vehículos, debe incluirse un grupo de control que no reciba tratamiento, además de un grupo de control del vehículo. Los animales del grupo o grupos de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo.

Administración de las dosis

19. La sustancia problema o el vehículo deben administrarse por la vía más pertinente para la posible exposición humana, y sobre la base de la información disponible relativa al metabolismo y distribución en los animales de ensayo. La vía de administración será generalmente oral (por ejemplo, vía oral forzada, con la alimentación, con el agua de bebida), pero pueden utilizarse otras vías (por ejemplo, cutánea, por inhalación), en función de las características y de las vías de exposición humana previstas o conocidas (se dan más orientaciones en el documento de orientación 43 (8)). Debe facilitarse una justificación de la vía de administración elegida. La sustancia problema debe administrarse todos los días a la misma hora más o menos.
20. La dosis administrada a cada animal debe basarse normalmente en la última determinación del peso corporal. No obstante, hay que ser prudente al adaptar la dosis en el último tercio de la gestación. Si se observa una toxicidad excesiva en las madres tratadas, estas deberán sacrificarse por métodos compasivos.
21. La sustancia problema o el vehículo deben administrarse como mínimo una vez al día a las hembras apareadas desde el momento de la implantación (DG 6) hasta el final de la lactancia (DPN 21), de forma que las crías estén expuestas a la sustancia durante su desarrollo neurológico, tanto pre como postnatal. La edad a la que se inicia la administración, así como la duración y la frecuencia de esta, podrán ajustarse en caso de que haya pruebas que apoyen otro diseño experimental más pertinente para la exposición humana. La duración de la administración debe ajustarse en caso de que se utilicen otras especies, para garantizar la exposición durante todas las fases tempranas del desarrollo del encéfalo (es decir, las equivalentes al crecimiento del encéfalo humano en los períodos prenatal y postnatal temprano). La administración puede comenzar desde el inicio de la gestación (DG 0), aunque debe prestarse atención al potencial de la sustancia problema para causar la muerte del embrión antes de la implantación. Si la administración comenzara el DG 6 se evitaría este riesgo, pero no se tratarían las fases de desarrollo entre los DG 0 y 6. Cuando un laboratorio compra animales ya apareados, es imposible comenzar la administración el DG 0, por lo que el DG 6 sería una buena opción para empezarla. El laboratorio de ensayo debe fijar la posología según la información pertinente disponible sobre los efectos de la sustancia problema, la experiencia previa y las consideraciones logísticas; puede incluirse la continuación de la administración pasado el destete. No debe administrarse la sustancia problema el día del parto a los animales que no hayan terminado de parir completamente. En general, se acepta que la exposición de las crías tiene lugar a través de la leche materna; sin embargo, debe considerarse la administración directa de la sustancia a las crías en los casos en que falten pruebas de la continuidad de la exposición de la descendencia. Pueden obtenerse estas pruebas de que la exposición continúa a partir de, por ejemplo, la información farmacocinética, la toxicidad para la descendencia o cambios en biomarcadores (28).

OBSERVACIONES

Observaciones sobre las madres

22. Todas las madres deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día para comprobar su estado de salud, incluida la morbilidad.
23. Durante los períodos de tratamiento y de observación, deben realizarse periódicamente (al menos dos veces durante el período de administración en la gestación y dos veces durante el período de administración en la lactancia) observaciones clínicas más detalladas, utilizando al menos diez madres por nivel de dosis. Los animales serán observados, fuera de su jaula de alojamiento, por técnicos especializados que no estén advertidos del tratamiento de los animales, utilizando procedimientos normalizados para minimizar el estrés de los animales y los sesgos de los observadores, y maximizar la fiabilidad entre los observadores. Cuando sea posible, se recomienda que todas las observaciones de un determinado estudio sean hechas por el mismo técnico.
24. La presencia de signos observados debe consignarse. Siempre que sea factible, se registrará también la magnitud de los signos observados. Las observaciones clínicas deben incluir, entre otras cosas, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, pauta inusual de respiración y/o respiración por la boca, y cualquier signo anómalo de micción o defecación).
25. También habrá de anotarse cualquier respuesta no habitual en lo que se refiere a la posición del cuerpo, el nivel de actividad (por ejemplo, aumento o disminución de la exploración de la zona normal) y la coordinación de los movimientos. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha (por ejemplo, contoneo o ataxia), postura (por ejemplo, espalda encorvada) y respuesta a la manipulación, a la colocación o a otros estímulos ambientales, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, convulsiones, temblores, estereotipias (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, movimientos anómalos de la cabeza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, lamido excesivo o mordiscos, automutilación, marcha hacia atrás, vocalización) o de agresión.

26. Los signos de toxicidad han de anotarse, incluidos el día de inicio, la hora del día, el grado y la duración.
27. Los animales deben pesarse en el momento en que se les administra la sustancia, al menos una vez por semana a lo largo de todo el estudio, el día del parto o cerca de este, y el día DPN 21 (destete). En los ensayos en que se emplee la vía oral forzada, las madres deben pesarse como mínimo dos veces por semana. Las dosis deben adaptarse en el momento de cada determinación del peso corporal, según proceda. El consumo de alimentos debe medirse al menos una vez por semana durante la gestación y lactancia. Debe medirse el consumo de agua al menos semanalmente, si la exposición es a través del suministro de agua.

Observaciones sobre los descendientes

28. Todos los descendientes deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día para detectar los signos de toxicidad y la morbimortalidad.
29. Durante los períodos de tratamiento y de observación, deben llevarse a cabo observaciones clínicas más detalladas de los descendientes. Los descendientes (al menos una cría/sexo/camada) serán observados por técnicos especializados que no estén advertidos del tratamiento de los animales, utilizando procedimientos normalizados para minimizar los sesgos y maximizar la fiabilidad entre los observadores. Cuando sea posible, se recomienda que las observaciones sean hechas por el mismo técnico. Como mínimo, deben supervisarse los parámetros descritos en los puntos 24 y 25 en la medida adecuada para la fase de desarrollo que se esté observando.
30. Han de anotarse todos los signos de toxicidad observados en los descendientes, incluidos el día de inicio, la hora del día, el grado y la duración.

Parámetros físicos y del desarrollo

31. Los cambios en los parámetros del desarrollo previos al destete (por ejemplo, despliegue de las orejas, apertura de los ojos, erupción de los incisivos) están muy correlacionados con el peso corporal (30)(31). El peso corporal puede ser el mejor indicador del desarrollo físico. La medición de parámetros del desarrollo se recomienda, por lo tanto, solo en el caso de que haya pruebas de que estos parámetros van a aportar información adicional. El calendario para la evaluación de estos parámetros se indica en el cuadro 1. En función de los efectos previstos y de los resultados de las mediciones iniciales, puede ser recomendable añadir puntos de medición adicionales o realizar las mediciones en otras fases del desarrollo.
32. Es recomendable utilizar la edad post-coital en lugar de la edad postnatal al evaluar el desarrollo físico (33). Si se someten a ensayo las crías el día del destete, se recomienda hacerlo antes del destete en sí, para evitar un efecto de confusión debido al estrés asociado con el destete. Además, debe evitarse realizar cualquier ensayo con las crías durante los dos días siguientes al destete.

Cuadro 1

Calendario de la evaluación de los parámetros físicos y del desarrollo, y de los parámetros funcionales/de comportamiento ^(a).

Parámetros	Períodos de edad		
	Antes del destete ^(b)	Antes de la madurez ^(b)	Adultos jóvenes ^(b)
Parámetros físicos y del desarrollo			
Peso corporal y observaciones clínicas	Semanalmente ^(c)	Al menos cada dos semanas	Al menos cada dos semanas
Peso del encéfalo	DPN 22 ^(d)		En el momento del sacrificio
Neuropatología	DPN 22 ^(d)		En el momento del sacrificio
Maduración sexual	—	Cuando corresponda	—
Otros parámetros del desarrollo ^(e)	Cuando corresponda	—	—

Parámetros	Períodos de edad		
	Antes del destete ^(b)	Antes de la madurez ^(b)	Adultos jóvenes ^(b)
Parámetros funcionales y de comportamiento			
Ontogenia del comportamiento	Al menos dos mediciones		
Actividad motriz (incluida la habituación)	1–3 veces ^(f)	—	Una vez
Funciones motrices y sensitivas	—	Una vez	Una vez
Aprendizaje y memoria	—	Una vez	Una vez

^(a) Este cuadro presenta el número mínimo de veces que se deben efectuar las mediciones. En función de los efectos previstos y de los resultados de las mediciones iniciales, puede ser recomendable añadir puntos de medición adicionales (por ejemplo, animales viejos) o realizar las mediciones en otras fases del desarrollo.

^(b) Se recomienda que las crías no se sometan a ensayo durante los dos días siguientes al destete (véase el punto 32). Las edades recomendadas para los ensayos con animales inmaduros son las siguientes: aprendizaje y memoria = DPN 25 ± 2; funciones motrices y sensitivas = DPN 25 ± 2. La edad recomendada para los ensayos con adultos jóvenes es DPN 60-70.

^(c) Los pesos corporales deben medirse al menos dos veces por semana cuando se administra la sustancia directamente a las crías, con el fin de ajustar las dosis en un período de rápido aumento del peso corporal.

^(d) El peso del encéfalo y la neuropatología pueden evaluarse en algún momento anterior (por ejemplo, DPN 11), cuando sea oportuno (véase el punto 39).

^(e) Deben registrarse cuando corresponda otros parámetros del desarrollo, además del peso corporal (por ejemplo, apertura de los ojos) (véase el punto 31).

^(f) Véase el punto 35.

33. Debe procederse al recuento de las crías vivas y a su asignación de sexo, por ejemplo por inspección visual o medición de la distancia anogenital (34)(35), y debe pesarse individualmente cada cría de una camada, al nacer o poco después, al menos una vez por semana a lo largo del período de lactancia, y posteriormente al menos una vez cada dos semanas. Al evaluar la madurez sexual, debe determinarse, al menos en un macho y una hembra por camada, la edad y el peso corporal del animal cuando se observe la permeabilidad vaginal (36) o la separación del prepucio (37).

Ontogenia del comportamiento

34. La ontogenia de determinados comportamientos debe medirse al menos en una cría/sexo/camada durante el período de edad apropiado, utilizándose las mismas crías en todos los días de ensayo en relación con todos los comportamientos evaluados. Los días de medición debe estar espaciados uniformemente a lo largo de dicho período para determinar si el cambio en la ontogenia del comportamiento es normal o si está relacionado con el tratamiento (38). A continuación se indican ejemplos de comportamientos cuya ontogenia puede evaluarse: reflejo de enderezamiento, geotaxia negativa y actividad motriz (38)(39)(40).

Actividad motriz

35. La actividad motriz debe supervisarse (41)(42)(43)(44)(45) durante el período de edad anterior al destete y en la edad adulta. Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. La sesión de ensayo debe ser lo suficientemente larga para demostrar la habituación dentro de la sesión de los controles no tratados. Se recomienda encarecidamente utilizar la actividad motriz para evaluar la ontogenia del comportamiento. Si se utiliza como ensayo de la ontogenia del comportamiento, deben utilizarse los mismos animales en todas las sesiones de ensayo previas al destete. Las observaciones deben hacerse con la frecuencia suficiente para evaluar la ontogenia de la habituación dentro de cada sesión (44). De esta manera, puede ser necesario recurrir a tres o más momentos de observación hasta el día del destete, este incluido (por ejemplo, DPN 13, 17, 21). También deben examinarse los mismos animales, o los compañeros de camada, en la edad adulta, casi al final del estudio (por ejemplo, DPN 60-70). Podrán realizarse ensayos en días adicionales en caso necesario. La actividad motriz debe supervisarse con un aparato de registro automático de la actividad, que debe ser capaz de detectar tanto los aumentos como los descensos de esta (es decir, la actividad de referencia medida por el dispositivo no debe ser tan baja que no se puedan detectar los eventuales descensos, ni tan elevada que no se puedan detectar los eventuales aumentos de la actividad). Cada dispositivo debe comprobarse mediante procedimientos estándar para garantizar, en la medida de lo posible, la fiabilidad del funcionamiento con diferentes dispositivos y en diferentes días. En la medida de lo posible, los grupos tratados deben repartirse de forma equilibrada entre los distintos dispositivos. Cada animal debe ser objeto de ensayo por separado. Los grupos tratados deben equilibrarse en cuanto

a los momentos del ensayo a fin de evitar confusiones debidas a los ritmos circadianos de actividad. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y no estén relacionadas sistemáticamente con el tratamiento. Entre las variables que pueden afectar a muchas mediciones del comportamiento, incluida la actividad motriz, están el nivel sonoro, el tamaño y la forma de las jaulas de ensayo, la temperatura, la humedad relativa, las condiciones de iluminación, los olores, el uso de las jaulas de alojamiento o de jaulas de ensayo distintas y las distracciones del entorno.

Funciones motrices y sensitivas

36. Las funciones motrices y sensitivas deben estudiarse detalladamente al menos una vez en el período previo a la madurez y una vez a lo largo del período de adultos jóvenes (por ejemplo, DPN 60-70). Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. Debe realizarse un número suficiente de ensayos a fin de garantizar un muestreo cuantitativo adecuado de modalidades sensitivas (por ejemplo, somatosensitiva, vestibular) y de funciones motrices (por ejemplo, fuerza, coordinación). Pueden citarse como ejemplos de ensayos de las funciones motrices y sensitivas los siguientes: reflejo de empuje extensor (46), reflejo de enderezamiento (47)(48), habituación al sobresalto acústico (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54), y potenciales provocados (55).

Ensayos de aprendizaje y memoria

37. Debe realizarse un ensayo de aprendizaje asociativo y memoria tras el destete (por ejemplo, 25 ± 2 días) y en el período de adultos jóvenes (DPN 60 y después). Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. En estas dos fases de desarrollo, pueden utilizarse los mismos ensayos u otros distintos. Se permite cierta flexibilidad en la elección de los ensayos de aprendizaje y memoria con ratas destetadas y adultas. Sin embargo, los ensayos deben concebirse de forma que cumplan dos criterios. En primer lugar, el aprendizaje debe evaluarse bien como un cambio en varias pruebas o sesiones de aprendizaje repetidas, o bien, en caso de ensayos que supongan una única prueba, con referencia a una condición de control de los efectos no asociativos de la experiencia de formación. En segundo lugar, los ensayos deben incluir alguna medida de la memoria (a corto o a largo plazo) además del aprendizaje original (adquisición), pero esta medida de la memoria no puede notificarse si se carece de una medida de la adquisición obtenida en el mismo ensayo. Si los ensayos de aprendizaje y memoria ponen de manifiesto la existencia de un efecto de la sustancia problema, puede considerarse la realización de ensayos adicionales para descartar las interpretaciones alternativas basadas en alteraciones de las capacidades sensitivas, motivacionales o motrices. Además de los dos criterios anteriores, se recomienda que el ensayo de aprendizaje y memoria se elija sobre la base de su sensibilidad probada para la clase de la sustancia problema, si se dispone de dicha información en la bibliografía. A falta de tal información, los siguientes son ejemplos de ensayos que podrían hacerse para cumplir los criterios citados: evitación pasiva (43)(56)(57), ajuste retrasado para la posición de las ratas adultas (58) y de las ratas lactantes (59), condicionamiento olfativo (43)(60), laberinto de agua de Morris (61)(62)(63), laberinto de Biel o Cincinnati (64)(65), laberinto de brazos radiales (66), laberinto en T (43), y adquisición y retención de comportamientos programados (26)(67)(68). En la bibliografía se encuentran descripciones de ensayos adicionales para ratas destetadas (26)(27) y ratas adultas (19)(20).

Autopsia

38. Los animales madre pueden sacrificarse después del destete de su descendencia.
39. La evaluación neuropatológica de la descendencia se efectuará utilizando los tejidos de los animales sacrificados de forma compasiva el DPN 22 o en un momento anterior, entre el DPN 11 y el DPN 22, así como al final del estudio. En el caso de los descendientes sacrificados hasta el DPN 22, deben evaluarse los tejidos del encéfalo; en el caso de los animales sacrificados al final del estudio, deben evaluarse los tejidos tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP). Los tejidos de los animales sacrificados el DPN 22 o antes pueden fijarse por inmersión o por perfusión; los de los animales sacrificados al final del estudio deben fijarse por perfusión. Todos los aspectos de la preparación de las muestras de tejido, desde la perfusión de los animales hasta la disección de las muestras de tejido, el tratamiento de los tejidos y la tinción de las preparaciones microscópicas, deben seguir un diseño equilibrado de forma que cada lote contenga muestras representativas de cada grupo de dosis. En el documento de orientación nº 20 de la OCDE (9) se encuentran orientaciones adicionales; véase también (103).

Tratamiento de las muestras de tejido

40. Deben registrarse todas las anomalías macroscópicas visibles en el momento de la autopsia. Las muestras de tejidos tomadas deben representar todas las regiones principales del sistema nervioso. Las muestras de tejidos deben conservarse en un fijador adecuado y tratarse de acuerdo con protocolos histológicos publicados y normalizados (69)(70)(71)(103). La inclusión en parafina es aceptable para los tejidos del SNC y del SNP, pero puede ser apropiada la utilización de osmio tras la fijación, junto con la inclusión en epoxirresina, cuando se necesite un mayor grado de resolución (por ejemplo, para los nervios periféricos cuando se sospeche una neuropatía periférica, o para el análisis morfológico de los nervios periféricos). Los tejidos del encéfalo recogidos para el análisis

morfométrico deben incluirse en los medios apropiados al mismo tiempo para todos los niveles de dosis, a fin de evitar artefactos por retracción que pueden asociarse con una conservación prolongada en el fijador (6).

Examen neuropatológico

41. Los objetivos del examen cualitativo son los siguientes:

- i) detectar las regiones del sistema nervioso que presentan indicios de alteraciones neuropatológicas;
- ii) identificar los tipos de alteraciones neuropatológicas resultantes de la exposición a la sustancia problema; así como
- iii) determinar el grado de gravedad de las alteraciones neuropatológicas.

Un anatomopatólogo con formación adecuada debe examinar al microscopio secciones histológicas representativas de las muestras de tejido para detectar los eventuales indicios de alteraciones neuropatológicas. A todas las alteraciones neuropatológicas se les debe asignar un grado subjetivo de gravedad. Una tinción con hematoxilina y eosina puede ser suficiente para evaluar las secciones del encéfalo de los animales sacrificados de forma compasiva el DPN 22 o antes. Sin embargo, se recomienda realizar una tinción de mielina (por ejemplo, azul de luxol rápido/violeta de cresilo) y una tinción de plata (por ejemplo, tinciones de Bielschowsky o de Bodian) para las secciones de tejidos del SNC y del SNP de los animales sacrificados al final del estudio. Según la opinión profesional del anatomopatólogo y el tipo de alteraciones observadas, pueden resultar adecuadas otras tinciones para identificar y caracterizar tipos concretos de alteraciones [por ejemplo, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o histoquímica de lectinas para evaluar las alteraciones de la glía y de la microglía (72), fluoro-jade para detectar necrosis (73)(74), o tinciones de plata específicas de la degeneración neuronal (75)].

42. Ha de efectuarse una evaluación morfométrica (cuantitativa), ya que estos datos pueden ayudar a la detección de un efecto relacionado con el tratamiento y son valiosos para la interpretación de las diferencias de peso o morfología del encéfalo relacionadas con el tratamiento (76)(77). Deben tomarse muestras de tejido nervioso, que han de prepararse para permitir las evaluaciones morfométricas. Entre estas se pueden incluir, por ejemplo, las mediciones lineales o superficiales de regiones específicas del encéfalo (78). Tales mediciones exigen la utilización de secciones homólogas, cuidadosamente seleccionadas en función de referencias microscópicas fiables (6). Puede utilizarse la estereología para identificar efectos relacionados con el tratamiento sobre parámetros tales como el volumen o el número de células de determinadas regiones neuroanatómicas (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Debe examinarse el encéfalo para detectar los eventuales indicios de alteraciones neuropatológicas relacionadas con el tratamiento y deben tomarse muestras adecuadas de todas sus regiones principales (por ejemplo, bulbos olfativos, corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo (techo, tegmento y pedúnculos cerebrales), protuberancia, bulbo raquídeo, cerebelo) para garantizar un examen exhaustivo. Es importante que se tomen las secciones de todos los animales en el mismo plano. En el caso de los adultos sacrificados de forma compasiva al final del estudio, deben tomarse muestras de las secciones representativas de la médula espinal y del SNP. Las zonas examinadas deben incluir el ojo con el nervio óptico y la retina, la médula espinal en los engrosamientos cervical y lumbar, las fibras de las raíces anteriores y posteriores, el nervio ciático mayor proximal, el nervio ciático poplíteo interno proximal (en la rodilla) y las ramas del nervio ciático poplíteo interno que inervan los músculos de la pantorrilla. Las secciones de la médula espinal y de los nervios periféricos tienen que incluir tanto una sección transversal como una longitudinal.

44. La evaluación neuropatológica debe incluir un examen para detectar eventuales signos de alteraciones del desarrollo del sistema nervioso (6)(85)(86)(87)(88)(89), además de alteraciones celulares (por ejemplo, vacuolización, degeneración o necrosis neuronal) y cambios histológicos (por ejemplo, gliosis, infiltración de leucocitos, formación de quistes). A este respecto, es importante que se distingan los efectos relacionados con el tratamiento de los acontecimientos normales del desarrollo que se sepa que se producen en una fase del desarrollo correspondiente al momento del sacrificio (90). Pueden citarse como ejemplos de alteraciones significativas que indican daño para el desarrollo las siguientes, sin ánimo de exhaustividad:

- alteraciones en el tamaño o la forma macroscópicos de los bulbos olfativos, el cerebro o el cerebelo;
- alteraciones en el tamaño relativo de las diversas regiones del encéfalo, como las disminuciones o aumentos del tamaño de regiones derivados de la pérdida o persistencia de poblaciones de células o proyecciones axónicas de carácter normalmente pasajero (por ejemplo, capa germinal externa del cerebelo, cuerpo calloso);
- alteraciones de la proliferación, migración y diferenciación, indicadas por zonas de necrosis o apoptosis excesivas, poblaciones agrupadas o dispersas de neuronas ectópicas, desorientadas o deformes, o alteraciones del tamaño relativo de diversos estratos de las estructuras corticales;

- alteraciones de las pautas de mielinización, como la reducción global del tamaño o la alteración de la tinción de las estructuras mielinizadas;
- signos de hidrocefalia, en particular la dilatación de los ventrículos, la estenosis del acueducto de Silvio y el adelgazamiento de los hemisferios cerebrales.

Análisis de la relación dosis-respuesta de las alteraciones neuropatológicas

45. Se recomienda seguir el siguiente procedimiento por fases para los análisis neuropatológicos cualitativos y cuantitativos. En primer lugar, se comparan las secciones del grupo de dosis alta con las del grupo de control. En caso de que no se detecten alteraciones neuropatológicas en los animales del grupo de dosis alta, no se requiere continuar el análisis. Si se encuentran indicios de alteraciones neuropatológicas en el grupo de dosis alta, se examinan los animales de los grupos de dosis intermedia y baja. Si el grupo de dosis alta se termina por causa de muerte o de otro tipo de toxicidad que implique confusión, deben analizarse los grupos de dosis alta e intermedia para detectar las eventuales alteraciones neuropatológicas. Si hay alguna indicación de neurotoxicidad en los grupos de la dosis inferior, debe realizarse con esos grupos el análisis neuropatológico. En caso de que en el examen cualitativo o cuantitativo se observen alteraciones neuropatológicas relacionadas con el tratamiento, deben determinarse la relación entre la dosis y la incidencia, y la frecuencia y el grado de gravedad de las lesiones o de las alteraciones morfométricas, sobre la base de una evaluación de todos los animales de todos los grupos de dosis. Deben incluirse en esta evaluación todas las regiones del encéfalo que presenten algún signo de alteración neuropatológica. Para cada tipo de lesión, deben describirse los criterios utilizados para definir los distintos grados de gravedad, indicando las características utilizadas para distinguir cada grado. Deben registrarse la frecuencia de cada tipo de lesión y su grado de gravedad, y debe realizarse un análisis estadístico para evaluar la naturaleza de la relación dosis-respuesta. Se recomienda el uso de preparaciones codificadas (91).

DATOS E INFORME

Datos

46. Los datos deben notificarse individualmente y resumirse en forma de cuadro, mostrándose para cada grupo de ensayo los tipos de cambio y el número de madres, de descendientes por sexo, y de camadas en las que se haya observado cada tipo de cambio. Si se ha utilizado la exposición postnatal directa de la descendencia, han de notificarse la vía, la duración y el período de la exposición.

Evaluación e interpretación de los resultados

47. Un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo debe proporcionar información sobre los efectos de la exposición continuada a una sustancia durante la vida intrauterina y en las primeras fases del desarrollo postnatal. Dado que el estudio se centra en parámetros tanto de toxicidad general como de neurotoxicidad para el desarrollo, los resultados deben permitir distinguir los efectos sobre el desarrollo neurológico que se producen en ausencia de toxicidad general para la madre frente a los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para la madre. Debido a la compleja interrelación entre el diseño del estudio, el análisis estadístico y la significación biológica de los datos, la interpretación adecuada de los datos de neurotoxicidad para el desarrollo implica el juicio de expertos (107)(109). Para la interpretación de los resultados del ensayo debe aplicarse un enfoque de ponderación de las pruebas (20)(92)(93)(94). Deben ser objeto de discusión las pautas de las eventuales observaciones conductuales o morfológicas, así como los datos sobre la relación dosis-respuesta. Deben incluirse en esta caracterización los datos de todos los estudios pertinentes para la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los estudios epidemiológicos o los informes de casos humanos, y los estudios con animales de experimentación (por ejemplo, datos de toxicocinética, información sobre la relación estructura-actividad, datos de otros estudios de toxicidad). Esto incluye la relación entre las dosis de la sustancia problema y la presencia o ausencia, la incidencia y el alcance de cualesquiera efectos neurotóxicos para cada sexo (20)(95).
48. La evaluación de los datos debe incluir una discusión de la significación tanto biológica como estadística. El análisis estadístico debe considerarse como una herramienta que orienta para la interpretación de los datos, más que determinarla. La falta de significación estadística no debe ser el único motivo para concluir que no hay ningún efecto relacionado con el tratamiento, al igual que la presencia de significación estadística no puede ser la única justificación para concluir que se da algún efecto relacionado con el tratamiento. Para evitar posibles resultados negativos falsos y las dificultades inherentes a "comprobar un resultado negativo", deben discutirse los datos sobre los controles positivos e históricos disponibles, especialmente cuando no se observen efectos relacionados con el tratamiento (102)(106). La probabilidad de encontrar positivos falsos debe discutirse a la luz de la evaluación estadística total de los datos (96). La evaluación debe incluir la posible relación existente entre las alteraciones neuropatológicas y conductuales observadas.

49. Todos los resultados deben analizarse utilizando modelos estadísticos adecuados para el diseño experimental (108). La elección de un análisis paramétrico o no paramétrico debe justificarse teniendo en cuenta factores tales como la naturaleza de los datos (transformados o no) y su distribución, así como la relativa solidez de los análisis estadísticos seleccionados. El objetivo y el diseño del estudio deben guiar la elección del análisis estadístico para minimizar los errores de tipo I (positivos falsos) y de tipo II (negativos falsos) (96)(97)(104)(105). Los estudios sobre el desarrollo con especies multíparas en los que se estudian varias crías por camada deben incluir la camada en el modelo estadístico para evitar un aumento de los índices de errores de tipo I (98)(99)(100)(101). La unidad estadística de medida debe ser la camada y no la cría. Los experimentos deben diseñarse de manera que las crías de una misma camada no se traten como observaciones independientes. Cualquier parámetro medido varias veces en el mismo sujeto se analizará utilizando modelos estadísticos que tengan en cuenta el carácter no independiente de dichas medidas.

Informe del ensayo

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

Sustancia problema:

- naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas;
- datos de identificación, incluido el origen;
- pureza del preparado, e impurezas conocidas o previstas.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua o de la solución salina fisiológica.

Animales de experimentación:

- especie y cepa empleada, y justificación en caso de que sea distinta de la rata;
- proveedor de los animales de experimentación;
- número, edad al inicio del ensayo, y sexo de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, agua, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la selección de las dosis;
- justificación de la vía y del período de administración;
- especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado;
- datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- método utilizado para la identificación inequívoca de las madres y de su descendencia;
- descripción detallada del procedimiento o procedimientos de aleatorización utilizados para asignar las madres a los grupos de tratamiento, para seleccionar las crías sobrantes que deben sacrificarse, y para asignar las crías a los grupos de ensayo;
- datos sobre la administración de la sustancia problema;
- conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos, en el agua de bebida o en el dispositivo de inhalación a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), en su caso;
- condiciones ambientales;
- datos de la calidad de los alimentos y del agua (por ejemplo, si es agua del grifo o destilada);
- fechas de inicio y terminación del estudio.

Procedimientos de observación y ensayo:

- descripción detallada de los procedimientos utilizados para normalizar las observaciones y procedimientos, así como definiciones operativas para asignar puntuación a las observaciones;
- lista de todos los procedimientos de ensayo utilizados y justificación de su empleo;
- datos de los procedimientos utilizados para los estudios conductuales/funcionales, anatomopatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos, con información y detalles sobre los dispositivos automáticos;
- procedimientos para calibrar y garantizar la equivalencia de los dispositivos y el equilibrio de los grupos de tratamiento en los procedimientos de ensayo;
- breve justificación de todas las decisiones que impliquen una opinión profesional.

Resultados (por separado y en resumen, incluidas la media y la varianza cuando proceda):

- número de animales al comienzo del estudio y número al final del mismo;
- número de animales y de camadas utilizadas para cada ensayo;
- número de identificación de cada animal y camada de la que procede;
- tamaño de las camadas y peso medio al nacer por sexo;
- datos del peso corporal y de los cambios de este, incluido el peso corporal final de las madres y de su descendencia;
- datos sobre consumo de alimentos, y de agua si procede (por ejemplo, si la sustancia problema se administra con el agua);
- datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad o mortalidad, con el momento y la causa de la muerte, si procede;
- naturaleza, gravedad, duración, día de inicio, hora del día, y evolución posterior de las observaciones clínicas detalladas;
- puntuación de cada parámetro del desarrollo (peso, maduración sexual y ontogenia del comportamiento) en cada momento de observación;
- descripción detallada de todas las observaciones conductuales, funcionales, neuropatológicas, neuroquímicas y electrofisiológicas por sexo, incluidos tanto los aumentos como los descensos respecto a los controles;
- observaciones de la autopsia;
- peso del encéfalo;
- eventuales diagnósticos derivados de lesiones y signos neurológicos, incluidas las enfermedades o procesos naturales;
- imágenes de observaciones modelo;
- imágenes de baja resolución para evaluar la homología de las secciones empleadas en relación con la morfometría;
- datos sobre la absorción y el metabolismo, incluidos los datos complementarios de un estudio toxicocinético aparte, si se dispone de ellos;
- tratamiento estadístico de los resultados, incluidos los modelos estadísticos utilizados para analizar los datos, y los resultados, con independencia de que sean significativos o no;
- lista del personal del estudio, incluida su formación profesional.

Discusión de los resultados:

- información sobre la relación dosis-respuesta, por sexo y grupo;
- relación de otros eventuales efectos tóxicos con la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia problema, por sexo y grupo;

- impacto de cualquier información toxicocinética sobre las conclusiones;
- semejanzas con los efectos de cualquier neurotóxico conocido;
- datos en apoyo de la fiabilidad y sensibilidad del método de ensayo (es decir, datos sobre controles positivos e históricos);
- eventual relación entre efectos neuropatológicos y funcionales;
- NOAEL o dosis de referencia para las madres y los descendientes, por sexo y grupo.

Conclusiones:

- discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluida la conclusión de si la sustancia problema ha provocado neurotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhague, Dinamarca, 13-14 de junio de 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponible en la dirección: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponible en la dirección: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OCDE (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OCDE (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OCDE, París. Julio de 2008. Disponible en la dirección: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OCDE (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OCDE, París, septiembre de 2003. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, Nueva York.
- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- (14) Capítulo B.34 del presente anexo, Ensayo de reproducción en una generación.
- (15) Capítulo B.35 del presente anexo, Estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones.
- (16) Capítulo B.43 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad en roedores.
- (17) Capítulo B.31 del presente anexo, Estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal.
- (18) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.
- (19) OMS (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, Nueva York: Centro de Publicaciones de la Organización Mundial de la Salud, Estados Unidos de América. Disponible en la dirección: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) OMS (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), Publicaciones de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Disponible en la dirección: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, Nueva York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, Nueva Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.
- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.

- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. En: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. En: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, Nueva York, pp. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, Nueva York, pp. 181-211.
- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. En: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, Nueva York. pp. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.

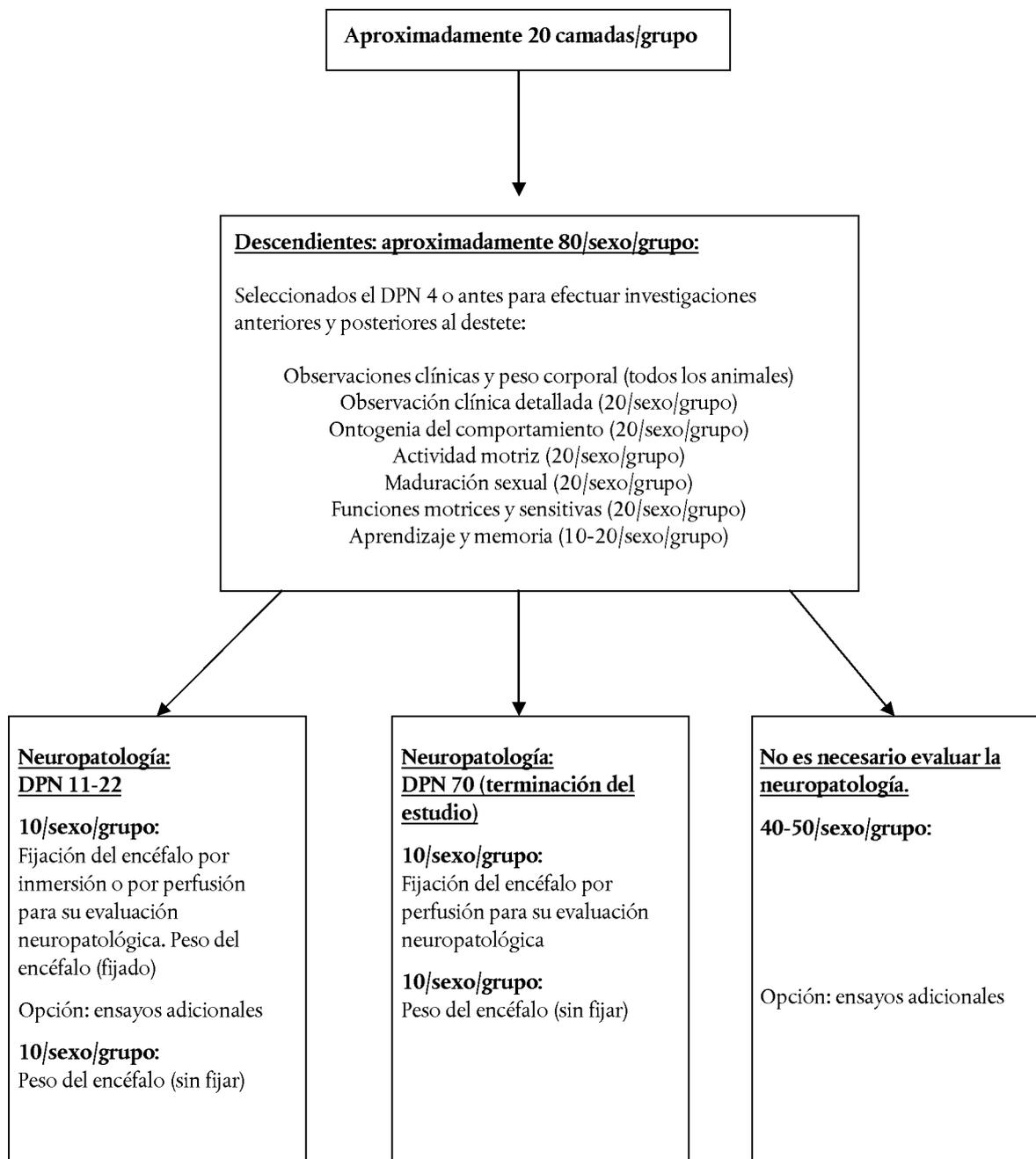
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosourea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, Londres.
- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.

- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S. H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. En: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, Nueva York, pp. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.
- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Segunda edición. Springer-Verlag, Berlín.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure estándares: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.

- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A “best practices” approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.
- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

Figura 1

Esquema general de los ensayos funcionales/conductuales, de evaluación neuropatológica y de pesaje del encéfalo. Este diagrama se basa en la descripción recogida en los puntos 13-15 (DPN = día postnatal). En el apéndice 1 se recogen ejemplos de asignación de los animales



Apéndice 1

1. A continuación se describen ejemplos de posibles asignaciones y se recogen en cuadros. Estos ejemplos se adjuntan para ilustrar que la asignación de los animales de experimentación a los distintos paradigmas de ensayo puede llevarse a cabo de varias maneras.

Ejemplo 1

2. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento anteriores al destete se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 22. Se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica. Por otra parte, se recogen los datos del peso de los encéfalos sin fijar de los 10 machos y 10 hembras restantes por dosis.
3. Para los ensayos funcionales/conductuales posteriores al destete (observaciones clínicas detalladas, actividad motriz, sobresalto acústico y ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez) y para evaluar la edad de la maduración sexual, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ*, se retira el encéfalo y se prepara para su evaluación neuropatológica.
4. Para el ensayo de la función cognitiva en adultos jóvenes (por ejemplo, DPN 60-70), se utiliza un tercer conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, se sacrifican al final del estudio 10 animales/sexo/grupo (1 macho o 1 hembra por camada), y se retira y pesa su encéfalo.
5. Los restantes 20 animales/sexo/grupo se reservan para eventuales ensayos adicionales.

Cuadro 1

Cría nº ^(a)		Nº de crías asignado al ensayo	Examen/ensayo
m	h		
1	5	20 m + 20 h	Ontogenia del comportamiento
		10 m + 10 h	Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 22
		10 m + 10 h	Pesaje del encéfalo DPN 22
2	6	20 m + 20 h	Observaciones clínicas detalladas
		20 m + 20 h	Actividad motriz
		20 m + 20 h	Maduración sexual
		20 m + 20 h	Funciones motrices y sensitivas
		20 m + 20 h	Aprendizaje y memoria (DPN 25)
		10 m + 10 h	Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70
3	7	20 m + 20 h	Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes)
		10 m + 10 h	Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes ~DPN 70
4	8	—	Animales de reserva para sustituciones o ensayos adicionales

^(a) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

Ejemplo 2

6. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento anteriores al destete se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 11. Se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica.
7. Para los ensayos posteriores al destete (observaciones clínicas detalladas, actividad motriz, evaluación de la edad de la maduración sexual y funciones motrices y sensitivas) se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ*, se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación neuropatológica.
8. Para el ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez y en adultos jóvenes, se utilizan 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada). Se utilizan animales distintos para los ensayos de la función cognitiva realizados el día DPN 23 y para los realizados con adultos jóvenes. Al finalizar el estudio, se sacrifican 10 animales/sexo/grupo de entre los utilizados para el ensayo con adultos, se retira el encéfalo y se pesa.
9. Los 20 animales/sexo/grupo restantes que no se han seleccionado para los ensayos se eliminan al destete.

Cuadro 2

Cría nº (ª)		Nº de crías asignado al ensayo	Examen/ensayo
m	h		
1	5	20 m + 20 h 10 m + 10 h	Ontogenia del comportamiento Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 11
2	6	20 m + 20 h 20 m + 20 h 20 m + 20 h 20 m + 20 h 10 m + 10 h	Observaciones clínicas detalladas Actividad motriz Maduración sexual Funciones motrices y sensitivas Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70
3	7	10 m + 10 h (ª)	Aprendizaje y memoria (DPN 23)
3	7	10 m + 10 h (ª)	Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes) Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes
4	8	—	Animales sacrificados y desechados el día DPN 21

(ª) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

(ª) Se utilizan crías diferentes para los ensayos de la función cognitiva realizados el día DPN 23 y para los realizados con adultos jóvenes (por ejemplo, de las camadas pares/impares del total de 20).

Ejemplo 3

10. Para el pesaje del encéfalo y la evaluación de la neuropatología del día DPN 11 se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 11, y se les retira el encéfalo, que se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica. Por otra parte, se recogen los datos del peso de los encéfalos sin fijar de los 10 machos y 10 hembras restantes por cada dosis.

11. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento (actividad motriz), los exámenes posteriores al destete (actividad motriz y evaluación de la edad de la maduración sexual), y el ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada).
12. Para los ensayos de las funciones motrices y sensitivas (sobresalto acústico) y las observaciones clínicas detalladas, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ*, se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación neuropatológica.
13. Para el ensayo de la función cognitiva en adultos jóvenes, se utiliza otro conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, se sacrifican al final del estudio 10 animales/sexo/grupo (1 macho o 1 hembra por camada), y se retira y pesa su encéfalo.

Cuadro 3

Cría nº (ª)		Nº de crías asignado al ensayo	Examen/ensayo
m	h		
1	5	10 m + 10 h 10 m + 10 h	Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 11 Pesaje del encéfalo DPN 11
2	6	20 m + 20 h 20 m + 20 h 20 m + 20 h 20 m + 20 h	Ontogenia del comportamiento (actividad motriz) Actividad motriz Maduración sexual Aprendizaje y memoria (DPN 27)
3	7	20 m + 20 h 20 m + 20 h 10 m + 10 h	Sobresalto acústico (período previo a la madurez y adultos jóvenes) Observaciones clínicas detalladas Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70
4	8	20 m + 20 h 10 m + 10 h	Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes) Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes

(ª) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

*Apéndice 2***Definiciones**

Sustancia: Sustancia o mezcla

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

B.54. BIOENSAYO UTEROTRÓFICO CON ROEDORES: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES ESTROGÉNICAS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 440 (2007). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos (1). Uno de los elementos de la actividad consistía en elaborar unas directrices para el bioensayo uterotrófico con roedores. El bioensayo uterotrófico con roedores se sometió entonces a un completo programa de validación, con la recopilación de un detallado documento de referencia (2)(3) y la realización de unos amplios estudios intra e interlaboratorios para demostrar la pertinencia y la reproducibilidad del bioensayo con un potente estrógeno de referencia, con agonistas débiles de los receptores estrogénicos, con un antagonista fuerte de los receptores estrogénicos, y con una sustancia de referencia negativa (4)(5)(6)(7)(8)(9). El presente método B.54 se basa en la experiencia obtenida con el programa de validación del ensayo y en los resultados conseguidos de esta manera con agonistas estrogénicos.
2. El bioensayo uterotrófico es un ensayo de cribado a corto plazo cuyo origen data de la década de 1930 (27)(28) y fue normalizado por primera vez con este carácter por un comité de expertos en 1962 (32)(35). Se basa en el aumento del peso del útero o respuesta uterotrófica (véase una revisión en la referencia 29). Evalúa la posibilidad de que una sustancia provoque actividades biológicas que concuerden con las de agonistas o antagonistas de los estrógenos naturales (por ejemplo, el 17 β -estradiol); sin embargo, su uso para detectar efectos antagonistas es mucho menos frecuente que para detectar efectos agonistas. El útero responde a los estrógenos de dos maneras. Una primera respuesta es el aumento de peso debido a la imbibición de agua. Esta respuesta va seguida de un aumento de peso debido al crecimiento tisular (30). Las respuestas del útero en ratas y ratonas son comparables cualitativamente.
3. Este bioensayo sirve de ensayo de cribado *in vivo* y su aplicación debe considerarse en el contexto del “OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) (apéndice 2). En este marco conceptual el bioensayo uterotrófico figura en el nivel 3 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre un solo mecanismo endocrino, a saber, la estrogenicidad.
4. Se pretende incluir el bioensayo uterotrófico en una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para identificar las sustancias con potencial para interactuar con el sistema endocrino, lo que desembocará finalmente en evaluaciones del riesgo para la salud humana o el medio ambiente. El programa de validación de la OCDE ha utilizado agonistas estrogénicos tanto fuertes como débiles, a fin de evaluar el comportamiento del ensayo en cuanto a la detección de sustancias estrogénicas (4)(5)(6)(7)(8). De este modo, se ha demostrado bien la sensibilidad del procedimiento de ensayo para los agonistas estrogénicos, además de una buena reproducibilidad intra e interlaboratorios.
5. Por lo que se refiere a sustancias negativas, se incluyó en el programa de validación una única sustancia “negativa” de referencia que ya se había considerado negativa en el ensayo uterotrófico, así como en ensayos *in vitro* de receptores y de unión a receptores, pero se han evaluado datos adicionales del ensayo, no relacionados con el programa de validación de la OCDE, que refuerzan el apoyo a la especificidad del bioensayo uterotrófico para el cribado de agonistas estrogénicos (16).

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

6. Los agonistas y antagonistas estrogénicos actúan como ligandos de los receptores estrogénicos α y β , y pueden activar o inhibir, respectivamente, la acción transcripcional de los receptores. Esto podría provocar peligros para la salud, incluidos ciertos efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Por lo tanto, es necesario evaluar con rapidez las sustancias como posibles agonistas o antagonistas estrogénicos. Aunque de carácter informativo, la afinidad de un ligando por un receptor estrogénico o la activación transcripcional de genes marcadores *in vitro* son solo uno de los varios factores determinantes de un posible peligro. Otros factores determinantes pueden ser la activación y la desactivación metabólica de la sustancia al entrar en el organismo, su distribución en los tejidos diana, y la eliminación del organismo, que dependen, al menos en parte, de la vía de administración y de la sustancia estudiada. Esto conduce a la necesidad de detectar la posible actividad de una sustancia *in vivo* en condiciones pertinentes, salvo que las características de la sustancia en relación con su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) ya aporten la información adecuada. Los tejidos uterinos responden con un crecimiento rápido y vigoroso al estímulo de los estrógenos, especialmente en el caso de los roedores de laboratorio, en los que el ciclo estral dura unos 4 días. Diversas especies de roedores, en particular la rata, se utilizan también ampliamente en estudios de toxicidad para la caracterización de los peligros. Por lo tanto, el útero de los roedores es un órgano diana adecuado para el ensayo de cribado *in vivo* de los agonistas y antagonistas estrogénicos.
7. El presente método de ensayo se basa en los protocolos empleados en el estudio de validación de la OCDE que han demostrado ser fiables y repetibles en estudios intra e interlaboratorios (5)(7). Actualmente se dispone de dos métodos, a saber, el de hembras adultas ovariectomizadas (método de las adultas ovx) y el de hembras inmaduras

no ovariectomizadas (método de las inmaduras). En el programa de validación de ensayos de la OCDE se ha demostrado que estos métodos presentan una sensibilidad y una reproducibilidad comparables. Sin embargo, el método de las hembras inmaduras, por tener estas intacto el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG), es en cierto modo menos específico, pero abarca un ámbito de investigación más amplio que el método de las hembras ovariectomizadas, ya que puede responder a las sustancias que interactúan con el eje HPG y no tan solo con el receptor estrogénico. El eje HPG de la rata es funcional a los 15 días de edad, aproximadamente. Antes de ese momento, no es posible acelerar la pubertad con tratamientos tales como la administración de la hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH). Cuando las hembras comienzan a alcanzar la pubertad, antes de la apertura vaginal, la hembra tiene varios ciclos silenciosos que no dan lugar a la apertura de la vagina ni a la ovulación, pero sí a algunas fluctuaciones hormonales. Si una sustancia estimula entonces directa o indirectamente el eje HPG, puede provocar una pubertad precoz, una ovulación precoz y una apertura vaginal acelerada. No solo las sustancias que actúan sobre el eje HPG tienen este efecto, sino que algunas dietas con niveles de energía metabolizable más altos que otras pueden estimular el crecimiento y acelerar la apertura de la vagina sin ser de efecto estrogénico. Tales sustancias no inducen una respuesta uterotrófica en animales adultos ovx ya que el eje HPG de estos no funciona.

8. Por razones de bienestar de los animales debe darse preferencia al método que utiliza ratas inmaduras, evitando así el pretratamiento quirúrgico de los animales y también el riesgo de no poder utilizar los animales que muestren algún signo de inicio del ciclo estral (véase el punto 30).
9. La respuesta uterotrófica no es totalmente de origen estrogénico, es decir, es posible que la produzcan otras sustancias, distintas de los agonistas o antagonistas estrogénicos. Por ejemplo, pueden dar lugar a esta respuesta dosis relativamente altas de progesterona, de testosterona, o de diversas progestinas sintéticas (30). Las eventuales respuestas pueden analizarse histológicamente para detectar la posible queratinización de la vagina (30). Independientemente del posible origen de la respuesta, un resultado positivo en un bioensayo uterotrófico debería lanzar en principio el procedimiento para aclarar la situación. Pueden obtenerse pruebas adicionales de estrogenicidad mediante ensayos *in vitro*, tales como el ensayo de unión a receptores estrogénicos y el ensayo de activación transcripcional, o mediante otros ensayos *in vivo* tales como el ensayo sobre la pubertad con hembras.
10. Teniendo en cuenta que el bioensayo uterotrófico sirve de ensayo de cribado *in vivo*, el enfoque de validación adoptado ha tenido en cuenta tanto el bienestar de los animales como la configuración de una estrategia de ensayos secuencial. Con este fin, el esfuerzo se ha dirigido a la validación rigurosa de la reproducibilidad y de la sensibilidad en cuanto a la estrogenicidad, que es la principal preocupación relativa a muchas sustancias, pero se ha insistido poco en cuanto al componente antiestrogénico del ensayo. Solo se ha sometido a ensayo un antiestrogénico con actividad fuerte, ya que es muy limitado el número de sustancias con un perfil antiestrogénico claro (sin interferencias por alguna actividad estrogénica). Por lo tanto, el presente método de ensayo está dedicado al protocolo estrogénico, mientras que el protocolo que describe el modo del ensayo de antagonistas se incluye en un documento de orientación (37). La reproducibilidad y la sensibilidad del ensayo para sustancias con actividad puramente antiestrogénica se definirán después de manera más clara, un vez que se haya utilizado sistemáticamente el procedimiento de ensayo durante algún tiempo y se hayan detectado más sustancias con esta modalidad de acción.
11. Se acepta que todos los procedimientos en los que se utilicen animales se atenderán a las normas locales de tratamiento de animales; las descripciones de tratamiento y atención de animales recogidas más adelante constituyen los requisitos mínimos de comportamiento, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (38). La OCDE proporciona más orientaciones sobre el tratamiento compasivo de los animales (25).
12. Como con todos los ensayos en que se utilicen animales vivos, es esencial asegurarse de que los datos son realmente necesarios antes del inicio del ensayo. Por ejemplo, dos situaciones en que puede cumplirse esta condición son las siguientes:
 - una elevada exposición potencial (nivel 1 del marco conceptual, apéndice 2) o indicios de estrogenicidad (nivel 2), a fin de analizar si estos efectos pueden producirse *in vivo*;
 - efectos indicadores de estrogenicidad en ensayos *in vivo* de nivel 4 o 5, para justificar que los efectos se referían a un mecanismo estrogénico que no puede dilucidarse utilizando un ensayo *in vitro*.
13. Las definiciones utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El bioensayo uterotrófico basa su sensibilidad en un sistema de ensayo con animales en los que el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios no está funcional, lo que provoca que los niveles endógenos de estrógenos circulantes sean bajos. De esta manera se garantiza que el peso uterino de referencia sea bajo y que se obtenga una banda máxima de respuesta a los estrógenos administrados. En las hembras de los roedores se dan dos situaciones de sensibilidad a los estrógenos que cumplen este requisito:
- i) hembras inmaduras tras el destete y antes de la pubertad, y
 - ii) hembras adultas jóvenes después de la ovariectomía, con tiempo suficiente para que retrocedan los tejidos uterinos.
15. La sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o inyección subcutánea. Se administran dosis graduadas de la sustancia problema a un mínimo de dos grupos de tratamiento (véase el punto 33 al respecto) de animales de experimentación, utilizando un solo nivel de dosis por grupo, con un período de administración de tres días consecutivos en el método de hembras inmaduras y un período mínimo de administración de tres días consecutivos en el método de las hembras adultas ovx. Tras unas 24 h después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Para detectar los agonistas estrogénicos, se evalúa la media del peso del útero de los grupos de animales tratados con la sustancia problema, comparando con el grupo al que se ha administrado solo el vehículo, atendiendo a un posible aumento estadísticamente significativo. Un aumento estadísticamente significativo de la media del peso del útero de un grupo de ensayo indica una respuesta positiva en este bioensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

16. Pueden utilizarse cepas de roedores de uso común en laboratorios. A modo de ejemplo, durante la validación se han utilizado las cepas de ratas Sprague-Dawley y Wistar. No deben utilizarse cepas de cuyos úteros se sepa o se sospeche que son menos sensibles. El laboratorio debe demostrar la sensibilidad de la cepa utilizada, según se describe en los puntos 26 y 27.
17. Las ratas y los ratones son especies utilizadas sistemáticamente en el bioensayo uterotrófico desde la década de 1930. Los estudios de validación de la OCDE solo se han realizado con ratas, ya que se piensa que estas especies son equivalentes y, por lo tanto, debe ser suficiente una sola especie para la validación a escala mundial, con el fin de ahorrar recursos y animales. La rata es la especie elegida en la mayoría de los estudios de toxicidad para la reproducción y el desarrollo. Teniendo en cuenta que existe una gran base de datos históricos sobre los ratones y para ampliar el ámbito de aplicación del método del bioensayo uterotrófico en roedores al uso de ratones como especie de ensayo, se ha realizado un estudio limitado de validación complementaria con ratones (16). Se ha seleccionado un enfoque comparativo con un número limitado de sustancias problema y de laboratorios participantes, y sin muestras codificadas, de acuerdo con la intención original de ahorrar recursos y animales. Este estudio de validación comparativo para el bioensayo uterotrófico en ratonas adultas jóvenes ovariectomizadas muestra que los datos obtenidos en ratas y ratones se corresponden bien, tanto cualitativa como cuantitativamente. Cuando el resultado del bioensayo uterotrófico pueda ser un dato preliminar para un estudio a largo plazo, se permitirá que se utilicen en ambos estudios los animales de la misma cepa y del mismo origen. El enfoque comparativo se limita a las ratonas ovx y el informe no aporta un conjunto sólido de datos para validar el modelo con hembras inmaduras, por lo que no se considera que el modelo con animales inmaduros quede incluido, en el caso de los ratones, en el ámbito de aplicación del presente método de ensayo.
18. Por lo tanto, en algunos casos es posible utilizar ratones en lugar de ratas. Debe darse una justificación si se usa esta especie, basada en estudios toxicológicos o farmacocinéticos o en otros criterios. Es posible que resulte necesario modificar el protocolo en el caso de los ratones. Por ejemplo, el consumo de alimentos de los ratones por unidad de peso corporal es más elevado que el de las ratas y, por lo tanto, el contenido de fitoestrógenos en los alimentos deberá ser menor en el caso de los ratones que en el de las ratas (9)(20)(22).

Condiciones de alojamiento y alimentación

19. Todos los procedimientos deben atenerse a las normas locales de tratamiento de animales de laboratorio. Estas descripciones de tratamiento y atención de animales constituyen los requisitos mínimos, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (38). El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (con una oscilación máxima aproximada de ± 3 °C). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y de preferencia no exceder del 70 %, salvo durante la limpieza del local. El objetivo debe ser conseguir una humedad relativa del 50-60 %. La iluminación debe ser artificial. La secuencia diaria de iluminación debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
20. Debe darse una dieta de laboratorio y agua de bebida *ad libitum*. Los animales adultos jóvenes pueden estar en jaulas individuales o bien en grupos de hasta tres animales. Debido a la corta edad de los animales inmaduros, se recomienda su alojamiento en grupos sociales.

21. Se sabe que un alto nivel de fitoestrógenos en las dietas de laboratorio hace aumentar el peso del útero de los roedores en un grado suficiente para interferir con el bioensayo uterotrónico (13)(14)(15). Unos niveles elevados de fitoestrógenos y de energía metabolizable en las dietas de laboratorio pueden dar lugar también a una pubertad precoz en animales inmaduros, si son estos los utilizados. La presencia de fitoestrógenos procede fundamentalmente de la inclusión de productos de soja y de alfalfa en las dietas de laboratorio, y se ha demostrado que las concentraciones de fitoestrógenos varían de un lote a otro en las dietas normales de laboratorio (23). El peso corporal es una variable importante, puesto que la cantidad de alimentos consumidos está relacionada con el peso corporal. Por consiguiente, la dosis realmente consumida de fitoestrógenos procedentes de la misma dieta puede variar según la especie y la edad (9). En el caso de las ratas hembras inmaduras, el consumo de alimentos por unidad de peso corporal puede ser aproximadamente el doble que en el de hembras adultas jóvenes ovariectomizadas. En el caso de las ratonas adultas jóvenes, el consumo de alimentos por unidad de peso corporal puede ser aproximadamente el cuádruple que en el de ratas adultas jóvenes ovariectomizadas.
22. Sin embargo, los resultados del bioensayo uterotrónico (9)(17)(18)(19) indican que la presencia de cantidades limitadas de fitoestrógenos en la dieta es aceptable y no reduce la sensibilidad del bioensayo. Como orientación, los niveles alimentarios de fitoestrógenos no deben superar los 350 µg de equivalentes de genisteína/gramo de dieta de laboratorio en el caso de las ratas hembras inmaduras de las cepas Sprague Dawley y Wistar (6)(9). Estas dietas deben ser apropiadas también cuando se someten a ensayo las ratas adultas jóvenes ovariectomizadas porque el consumo de alimentos por unidad de peso corporal es menor en adultos jóvenes que en animales inmaduros. Si se van a utilizar ratonas adultas ovariectomizadas o ratas más sensibles a los fitoestrógenos, debe considerarse una reducción proporcional en los niveles de fitoestrógenos de la dieta (20). Además, las diferencias en la energía metabólica disponible de las distintas dietas puede provocar cambios temporales del inicio de la pubertad (21)(22).
23. Antes del estudio debe seleccionarse cuidadosamente una dieta sin un nivel elevado de fitoestrógenos [véanse al respecto las referencias (6) y (9)] o de energía metabolizable para evitar introducir confusión en los resultados (15)(17)(19)(22)(36). El garantizar el comportamiento adecuado del sistema de ensayo utilizado por el laboratorio como se indica en los puntos 26 y 27 es una comprobación importante de estos dos factores. Como medida de seguridad coherente con unas buenas prácticas de laboratorio (BPL), deben tomarse muestras representativas de cada uno de los lotes de la dieta administrados durante el estudio, con vistas a efectuar posibles análisis del contenido de fitoestrógenos (por ejemplo, en el caso de unos elevados pesos uterinos de los animales de control respecto a los controles históricos, o de una respuesta inadecuada al estrógeno de referencia, el 17-alfa-etinil-estradiol). Deben analizarse alícuotas como parte del estudio o bien congelarse a - 20 °C o de forma que se evite que la muestra se descomponga antes de su análisis.
24. Algunos materiales de cama pueden contener sustancias estrogénicas o antiestrogénicas naturales (por ejemplo, se sabe que las mazorcas de maíz afectan a los ciclos estrales de las ratas y actúan como antiestrogénos). El material de cama seleccionado debe contener el mínimo posible de fitoestrógenos.

Preparación de los animales

25. Los animales de experimentación, que no deben mostrar signos de ningún tipo de enfermedad ni anomalías físicas, se reparten aleatoriamente entre los grupos de tratamiento y los de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Los animales se identifican inequívocamente. Es preferible que los animales inmaduros se alojen con sus madres o con madres de sustitución hasta el destete durante la aclimatación. La fase de aclimatación antes del inicio del estudio debe durar aproximadamente 5 días en el caso de los animales adultos jóvenes y en el de los animales inmaduros entregados con sus madres o con madres de sustitución. Si se obtienen animales inmaduros ya destetados sin las madres, puede imponerse una duración más corta de la fase de aclimatación, ya que la administración de la sustancia problema debe iniciarse inmediatamente tras el destete (véase el punto 29).

PROCEDIMIENTO

Verificación de la competencia del laboratorio

26. Para verificar la competencia del laboratorio pueden utilizarse dos opciones distintas:
 - verificación periódica, sobre la base de un estudio del control positivo de referencia inicial (véase el punto 27); al menos cada 6 meses y cada vez que se produzca una modificación que pueda influir en el comportamiento del ensayo (por ejemplo, una nueva formulación de la dieta, un cambio en el personal que efectúe las disecciones, un cambio en la cepa de animales o en su proveedor, etc.) debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo (modelo animal) utilizando una dosis adecuada (sobre la base del estudio del control positivo de referencia descrito en el punto 27) de un estrógeno de referencia: el 17a-etinil-estradiol (nº CAS 57-63-6) (EE);
 - uso de controles simultáneos, mediante la inclusión de un grupo al que se le administra una dosis adecuada del estrógeno de referencia en cada ensayo.

Si el sistema no es capaz de responder según lo esperado, hay que examinar las condiciones experimentales y modificarlas en consecuencia. Se recomienda que la dosis del estrógeno de referencia utilizada en ambos enfoques sea aproximadamente la DE70 u 80.

27. **Estudio del control positivo de referencia** Antes de que un laboratorio realice un estudio por primera vez según el presente método de ensayo, debe demostrar su competencia determinando la sensibilidad del modelo animal y estableciendo la relación dosis-respuesta de un estrógeno de referencia, el 17 α -etinil-estradiol (n $^{\circ}$ CAS 57-63-6) (EE), con un mínimo de cuatro dosis. La respuesta del peso del útero se comparará con los datos históricos establecidos [véase la referencia (5)]. Si este estudio del control positivo de referencia no produce los resultados previstos, deberán examinarse y modificarse las condiciones experimentales.

Número y estado de los animales

28. Cada grupo tratado y de control ha de incluir al menos 6 animales (para los protocolos tanto del método con animales inmaduros como del de animales adultos ovx).

Edad de los animales inmaduros

29. Para el bioensayo uterotrófico con animales inmaduros debe especificarse el día de nacimiento. La administración de la sustancia problema ha de empezar lo suficientemente pronto como para garantizar que al término de dicha administración no ha tenido lugar aún la subida fisiológica de los estrógenos endógenos asociada a la pubertad. Por otra parte, hay indicios de que los animales muy jóvenes puede ser menos sensibles. Para definir la edad óptima, cada laboratorio debe tomar en consideración sus propios datos de referencia sobre la maduración.

Como norma general, la administración a ratas puede comenzar inmediatamente tras un destete temprano, el día postnatal 18 (considerándose que el día postnatal 0 es el del nacimiento). La administración a ratas debe estar completada de preferencia el día postnatal 21 y en cualquier caso antes del día postnatal 25, ya que a partir de esta edad se hace funcional el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios y es posible que empiecen a subir los niveles de estrógenos endógenos, con una elevación concomitante de la media del peso uterino de referencia y un aumento de las desviaciones típicas de los grupos (2)(3)(10)(11)(12).

Procedimiento para la ovariectomía

30. Respecto a las ratas y ratonas que se han de ovariectomizar (grupos tanto de tratamiento como de control), la ovariectomía debe efectuarse cuando tienen entre 6 y 8 semanas de edad. En el caso de las ratas, deben pasar al menos 14 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración, a fin de permitir que el útero retroceda a un peso de referencia estable y mínimo. En el caso de las ratonas, deben pasar al menos 7 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración. Como una pequeña cantidad de tejido ovárico es suficiente para producir niveles significativos de estrógenos circulantes (3), antes de utilizar a los animales hay que examinarlos observando las células epiteliales recogidas por frotis vaginal durante al menos cinco días consecutivos (por ejemplo, los días 10-14 tras la ovariectomía en el caso de las ratas). No deben utilizarse los animales que presenten algún signo de inicio de un ciclo estral. Además, en la autopsia, deben examinarse los muñones ováricos para comprobar si queda algo de tejido ovárico. En caso afirmativo, el animal no debe utilizarse en los cálculos (3).
31. El procedimiento de ovariectomía se inicia con el animal, una vez anestesiado correctamente, en decúbito prono. La incisión de apertura de la pared abdominal dorso-lateral debe tener una longitud aproximada de 1 cm en el punto medio entre el reborde costal inferior y la cresta ilíaca, y estar a unos pocos milímetros del borde lateral del músculo lumbar. El ovario debe extraerse de la cavidad abdominal y ponerse en un campo aséptico. El ovario debe desconectarse en la unión del oviducto con el cuerpo uterino. Tras confirmar que no se está produciendo ninguna hemorragia fuerte, la pared abdominal se cierra mediante sutura y la piel mediante autoclips o sutura adecuada. En la figura 1 se indican esquemáticamente los puntos de ligadura. Debe aplicarse una analgesia postoperatoria adecuada, según lo recomendado por un veterinario con experiencia en el tratamiento de roedores.

Peso corporal

32. En el método con hembras adultas ovx, el peso corporal y el peso uterino no están correlacionados puesto que el peso uterino se ve afectado por hormonas como los estrógenos, pero no por los factores de crecimiento que regulan el tamaño corporal. Por el contrario, el peso corporal está relacionado con el peso uterino en el modelo con hembras inmaduras, en la fase de maduración (34). Así pues, al principio del experimento, la variación de peso entre los animales empleados en el modelo con hembras inmaduras ha de ser mínima y no superar el $\pm 20\%$

del peso medio. Esto significa que el tamaño de la camada debe ser normalizado por el criador, para garantizar que los descendientes de madres diferentes se alimentan de forma aproximadamente igual. Los animales deben asignarse a los grupos (tanto de control como de tratamiento) mediante distribución aleatorizada de los pesos, de forma que la media del peso corporal de cada grupo no sea estadísticamente diferente de la de los demás grupos. Debe prestarse atención para evitar la asignación de animales de la misma camada al mismo grupo de tratamiento, en la medida de lo posible, sin incrementar el número de camadas que deban utilizarse en la investigación.

Posología

33. Con el fin de establecer si una sustancia problema puede tener acción estrogénica *in vivo*, normalmente es suficiente con dos grupos tratados y un grupo de control, por lo que este diseño es el preferido por razones de bienestar de los animales. Si la finalidad es obtener una curva dosis-respuesta o bien extrapolar a dosis más bajas, son necesarios al menos tres grupos tratados. Si hace falta obtener información más allá de la identificación de una actividad estrogénica (tal como una estimación de la potencia), debe considerarse una posología diferente. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia problema, el grupo de control recibirá la misma cantidad de vehículo utilizado con los grupos tratados (o el mayor volumen utilizado con los grupos de ensayo si hay diferencias entre los grupos).
34. El objetivo en el caso del bioensayo uterotrófico es seleccionar las dosis que garanticen la supervivencia y que no impliquen toxicidad significativa ni malestar para los animales después de tres días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis máxima de 1 000 mg/kg/d. Todas las dosis deben proponerse y seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad, cinética o toxicocinética para la sustancia problema o productos afines. La dosis más alta debe tener en cuenta en primer lugar la DL50 y la información disponible sobre la toxicidad aguda, a fin de evitar la muerte y el sufrimiento o el dolor intenso de los animales (24)(25)(26). La dosis más alta debe representar la dosis máxima tolerada (DMT); también es aceptable un estudio realizado con una dosis que haya inducido una respuesta uterotrófica positiva. Como ensayo de cribado, es aceptable en general utilizar grandes intervalos entre las distintas dosis, como, por ejemplo, de media unidad logarítmica, correspondiente a un factor de progresión de las dosis de 3,2, o incluso hasta una unidad logarítmica. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de determinación de la gama de dosis.
35. También, si la potencia estrogénica de un agonista puede estimarse con datos *in vitro* o *in silico*, es posible tener en cuenta estos datos para la selección de las dosis. Por ejemplo, la cantidad de la sustancia problema que produciría respuestas uterotróficas equivalentes a las del agonista de referencia (etinil-estradiol) se calcula a partir de su potencia *in vitro* en comparación con la del etinil-estradiol. La dosis máxima de ensayo se obtendría multiplicando esta dosis equivalente por un factor adecuado como, por ejemplo, 10 o 100.

Consideraciones para la determinación de la gama de dosis

36. En caso de necesidad, puede llevarse a cabo con unos pocos animales un estudio previo de determinación de la gama de dosis. A este respecto, puede utilizarse el documento de orientación nº 19 de la OCDE (25), donde se definen los signos clínicos indicativos de toxicidad o de malestar de los animales. Cuando sea posible en este estudio de determinación de la gama de dosis, tras administrar la sustancia durante tres días, puede extraerse el útero y pesarse, una vez hayan transcurrido unas 24 horas desde la administración de la última dosis. Estos datos pueden utilizarse a continuación para ayudar a diseñar el estudio principal (selección de la dosis máxima aceptable y de las dosis más bajas, y recomendación del número de grupos de dosis).

Administración de las dosis

37. La sustancia problema se administra por vía oral forzada o inyección subcutánea. A la hora de elegir la vía de administración, han de tenerse en cuenta las consideraciones sobre el bienestar de los animales, junto con aspectos toxicológicos como la pertinencia para la vía de exposición humana a la sustancia (por ejemplo, vía oral forzada para simular la ingestión, inyección subcutánea para simular la inhalación o la adsorción cutánea), las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema y, en especial, la información toxicológica disponible y los datos sobre metabolismo y cinética (por ejemplo, necesidad de evitar el metabolismo de primer paso, mayor eficacia a través de una vía concreta).
38. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de una solución o suspensión acuosa. Sin embargo, dado que la mayoría de los ligandos estrogénicos o sus precursores metabólicos tienden a ser hidrófobos, el enfoque más común es el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz, de cacahuete, de sésamo o de oliva). Sin embargo, estos aceites presentan diferentes contenidos de calorías y de grasas, con lo que el vehículo podría afectar al total de energía metabolizable (EM), lo que podría alterar ciertos parámetros medidos, como el peso del útero, particularmente en el método con hembras inmaduras (33). Por lo tanto, antes de realizar el estudio, hay que someter a ensayo todos los vehículos utilizados, frente a controles sin

vehículos. Las sustancias problema pueden disolverse en una cantidad mínima de etanol al 95 % u otro disolvente adecuado, y diluirse en el vehículo del ensayo hasta alcanzar las concentraciones finales de trabajo. Deben conocerse las características tóxicas del disolvente, y este debe someterse a ensayo por separado, en un grupo de control al que se administre solo el disolvente. Si la sustancia problema se considera estable, es posible recurrir a un calentamiento suave y a una acción mecánica vigorosa para ayudar a disolverla. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Si es estable en toda la duración del estudio, puede prepararse una alícuota inicial de la sustancia problema, y después preparar cada día las diluciones especificadas para la administración.

39. El calendario de la administración dependerá del modelo utilizado (véase el punto 29 en relación con el modelo de hembras inmaduras y el punto 30 en relación con el de hembras adultas ovx). Las ratas inmaduras reciben la sustancia problema diariamente, durante tres días consecutivos. Se recomienda también un tratamiento de tres días para ratas ovariectomizadas, pero pueden aceptarse exposiciones más largas, con la posibilidad de mejorar la detección de sustancias débilmente activas. Con ratonas ovariectomizadas, la aplicación durante tres días debe ser suficiente, y no aporta ninguna ventaja significativa la extensión del plazo a hasta siete días con agonistas estrogénicos fuertes; sin embargo, esta relación no se ha demostrado en el estudio de validación (16) en el caso de los estrógenos débiles, por lo que la administración debe ampliarse a hasta siete días consecutivos en ratonas adultas ovx. Las dosis deben administrarse todos los días a una hora similar. Deben ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal (por ejemplo, mg de sustancia problema por kg de peso corporal por día). En lo que respecta al volumen de ensayo, su variabilidad, por unidad de peso corporal, debe reducirse al mínimo ajustando la concentración de la solución administrada para garantizar un volumen constante por unidad de peso corporal con todas las dosis y con todas las vías de administración.
40. Cuando la sustancia problema se administra por vía oral forzada, debe hacerse en una sola dosis diaria y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Deben seguirse las normas locales de tratamiento de animales, pero el volumen no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, con las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal.
41. Cuando la sustancia problema se administra por inyección subcutánea, debe hacerse en una sola dosis diaria. Las dosis deben administrarse en las regiones dorsoescapular o lumbar con una aguja estéril (por ejemplo de calibre de 23 o 25 G) y una jeringuilla de tuberculina. Es opcional rasurar el lugar de la inyección. Deben registrarse los eventuales vertidos, las fugas en el punto de inyección o la administración incompleta de la sustancia problema. El volumen total inyectado por rata al día no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, dividido en dos lugares de inyección, excepto en el caso de soluciones acuosas, de las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal.

Observaciones

Observaciones generales y clínicas

42. Deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con más frecuencia si se observan signos de toxicidad. Las observaciones deben llevarse a cabo preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período previsto de efecto máximo tras la administración. Todos los animales deben observarse para registrar su mortalidad y morbilidad y los signos clínicos generales, tales como cambios en el comportamiento, la piel, el pelo, los ojos, las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones, y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.).

Peso corporal y consumo de alimentos

43. Todos los animales deben pesarse diariamente con precisión de 0,1 g, empezando justo antes de que se inicie el tratamiento, es decir, cuando los animales se asignan a los grupos. Con carácter optativo, es posible medir por jaula la cantidad de alimentos consumidos durante el período del tratamiento, pesando los alimentadores. Los resultados del consumo de alimentos deben expresarse en gramos por rata y por día.

Disección y pesaje del útero

44. Veinticuatro horas después del último tratamiento, las ratas se sacrificarán de forma compasiva. Lo ideal es que el orden de la autopsia se aleatorice entre los distintos grupos para evitar una progresión directa de los grupos de más dosis a los de menos (o viceversa), que podría afectar sutilmente a los datos. El objetivo del bioensayo es medir el peso de los úteros tanto húmedos como secos. El peso húmedo incluye el útero y el contenido de líquido luminal. El peso seco se mide después de haber exprimido y retirado el contenido luminal del útero.

45. Antes de su disección, la vagina se examinará para observar su estado de apertura en los animales inmaduros. El procedimiento de disección comienza con la apertura de la pared abdominal a partir de la sínfisis púbica. A continuación, se desprenden de la pared abdominal dorsal los cuernos uterinos y los ovarios, si están presentes. La vejiga urinaria y los uréteres se separan de las caras ventral y lateral del útero y de la vagina. Se desprenden las adherencias fibrosas entre el recto y la vagina hasta que pueda identificarse la unión del orificio vaginal con la piel perineal. El útero y la vagina se desprenden del cuerpo cortando la pared vaginal justo por encima de la unión con la piel perineal como se muestra en la figura 2. El útero debe separarse del cuerpo cortando delicadamente el mesenterio uterino en el punto de su inserción a lo largo de toda la longitud de la cara dorsolateral de cada cuerno uterino. Una vez retirado del cuerpo, la manipulación del útero debe ser lo suficientemente rápida para impedir la desecación de los tejidos. La pérdida de peso debida a la desecación se vuelve más importante con tejidos pequeños, tales como el útero (23). Si están presentes, los ovarios se retiran a la altura de los oviductos, evitando la pérdida de líquido luminal por el cuerno uterino. Si el animal ha sido ovariectomizado, hay que examinar los muñones para detectar la posible presencia de algún tejido ovárico. Debe retirarse el exceso de grasa y de tejido conjuntivo. La vagina se retira del útero justo por debajo del cuello uterino, de forma que este siga unido al cuerpo del útero, como se indica en la figura 2.
46. Cada útero debe transferirse a un recipiente marcado de manera inequívoca y tarado (por ejemplo, una placa de Petri o una navecilla de pesaje de plástico), prestando siempre atención para evitar la desecación antes del pesaje (por ejemplo, puede colocarse en el recipiente un trozo de papel de filtro ligeramente humedecido con solución salina). Debe pesarse el útero con el líquido luminal (peso uterino húmedo), con una precisión de 0,1 mg.
47. Cada útero se trata a continuación por separado para retirarle el líquido luminal. Los dos cuernos uterinos se perforan o cortan longitudinalmente. El útero se coloca sobre un trozo de papel de filtro ligeramente humedecido (por ejemplo, Whatman nº 3) y se le aplica una ligera presión con otro trozo de papel de filtro ligeramente humedecido, para eliminar completamente el líquido luminal. Debe pesarse el útero sin el contenido luminal (peso uterino seco), con una precisión de 0,1 mg.
48. El peso del útero en el momento del sacrificio puede utilizarse para asegurarse de que no se ha superado la edad adecuada en la rata inmadura intacta; sin embargo, son decisivos al respecto los datos históricos de la cepa de ratas utilizada en el laboratorio (véase el punto 56 en cuanto a la interpretación de los resultados).

Investigaciones optativas

49. Tras efectuar el pesaje, los úteros pueden fijarse en formol al 10 % amortiguado a pH neutro para su examen histopatológico previa tinción con hematoxilina y eosina (HE). La vagina puede investigarse adecuadamente (véase el punto 9). Además, puede efectuarse con fines de comparación cuantitativa una medición morfométrica del epitelio del endometrio.

DATOS E INFORME

Datos

50. Los datos del estudio deben incluir:
 - el número de animales al inicio del ensayo,
 - el número y la identidad de los animales encontrados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, y la fecha y la hora de la muerte o del sacrificio compasivo,
 - el número y la identidad de los animales que presenten signos de toxicidad, y una descripción de los signos de toxicidad observados, con inclusión del momento de aparición, la duración y la gravedad de los efectos tóxicos, y
 - el número y la identidad de los animales que presenten lesiones y una descripción del tipo de lesiones.
51. Deben registrarse los datos de cada animal relativos al peso corporal, el peso uterino húmedo, y el peso uterino seco. Deben utilizarse análisis estadísticos unilaterales de los agonistas para determinar si la administración de una sustancia problema ha provocado un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) del peso uterino. Deben llevarse a cabo análisis estadísticos apropiados para determinar los eventuales cambios del peso uterino seco y húmedo relacionados con el tratamiento. Por ejemplo, los datos pueden evaluarse mediante un análisis de la covarianza (ANCOVA) con el peso corporal en la autopsia como covariable. Antes del análisis de los datos uterinos, se les puede aplicar una transformación logarítmica de estabilización de la varianza. La prueba de Dunnett y Hsu es adecuada para hacer comparaciones por parejas de cada uno de los grupos tratados respecto a los grupos de control del vehículo, y para calcular los intervalos de confianza. Pueden utilizarse gráficas residuales estudentizadas para detectar posibles valores atípicos y evaluar la homogeneidad de las varianzas. Estos procedimientos se

aplicaron en el programa de validación de la OCDE utilizando el PROC GLM en el sistema de análisis estadísticos (SAS Institute, Cary, NC), versión 8 (6)(7).

52. El informe final debe contener lo siguiente:

Instalaciones de ensayo:

- Personal responsable y sus tareas en el estudio
- Datos del ensayo del control positivo de referencia y datos de los controles positivos periódicos (véanse los puntos 26 y 27)

Sustancia problema:

- Caracterización de las sustancias problema
- Naturaleza física y, cuando sea pertinente, propiedades fisicoquímicas
- Método y frecuencia de la preparación de las diluciones
- Eventuales datos obtenidos sobre la estabilidad
- Eventuales análisis de las soluciones administradas

Vehículo:

- Caracterización del vehículo del ensayo (naturaleza, proveedor y lote)
- Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua

Animales de experimentación:

- Especie y cepa, y justificación de su elección
- Proveedor e instalación específica del proveedor
- Edad de suministro con la fecha de nacimiento
- En caso de animales inmaduros, si se han suministrado o no con sus madres o con madres de sustitución, y la fecha del destete
- Datos del procedimiento de aclimatación de los animales
- Número de animales de cada jaula
- Datos y método de identificación de cada animal y de los grupos

Condiciones del ensayo:

- Datos del proceso de aleatorización (es decir, método utilizado)
- Justificación de la selección de la dosis
- Datos sobre la formulación de la sustancia problema, su concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad
- Datos de la administración de la sustancia problema y justificación de la elección de la vía de exposición
- Dieta (denominación, tipo, proveedor, contenido, y, si se conocen, los niveles de fitoestrógenos)
- Origen del agua (por ejemplo, agua del grifo o agua filtrada) y suministro (por tubos a partir de un gran depósito, en botellas, etc.)
- Camas (denominación, tipo, proveedor y contenido)
- Registro de las condiciones de alojamiento en las jaulas, intervalo de iluminación, temperatura y humedad del local, limpieza de este
- Descripción detallada de los procedimientos de autopsia y de pesaje de los úteros
- Descripción de los métodos estadísticos

*Resultados**Respecto a cada animal:*

- Todos los pesos corporales individuales diarios (desde la asignación en grupos hasta la autopsia) (con precisión de 0,1 g)
- Edad de cada animal (en días contados a partir del día de nacimiento, que es el día 0) cuando se inicia la administración de la sustancia problema
- Fecha y hora de cada administración de la sustancia problema
- Volúmenes y cantidades calculados que se han administrado y observaciones de las eventuales pérdidas de dosis durante o tras la administración
- Anotación diaria del estado de los animales, incluidos los síntomas y observaciones pertinentes
- Causa sospechada de la muerte (si durante el estudio se encuentran animales moribundos o muertos)
- Fecha y hora del sacrificio compasivo, con el intervalo de tiempo transcurrido desde la última administración
- Peso uterino húmedo (con precisión de 0,1 mg) y eventuales observaciones sobre pérdidas del líquido luminal durante la disección y la preparación para el pesaje
- Peso uterino seco (con precisión de 0,1 mg)

Respecto a cada grupo de animales:

- MEDIA de los pesos corporales diarios (con precisión de 0,1 g) y desviaciones típicas (desde la asignación en grupos hasta la autopsia)
- MEDIA de los pesos uterinos húmedos y media de los pesos uterinos secos (con precisión de 0,1 mg) y desviaciones típicas
- Si se ha medido, el consumo diario de alimentos (calculado como gramos de alimentos consumidos por animal)
- Resultados de los análisis estadísticos de comparación de los pesos uterinos húmedo y seco de los grupos tratados respecto a los mismos parámetros medidos en los grupos de control del vehículo
- Resultados de los análisis estadísticos de comparación de los pesos corporales totales y del aumento de peso corporal de los grupos tratados respecto a los mismos parámetros medidos en los grupos de control del vehículo.

53. Resumen de los datos importantes del método de ensayo

	Ratas	Ratonas
Animales		
Cepa	Cepa de roedores utilizada habitualmente en laboratorio	
Número de animales	Mínimo de 6 animales por grupo de dosis	
Número de grupos	Mínimo de dos grupos de tratamiento (véase el punto 33 al respecto) y un grupo de control negativo En los puntos 26 y 27 se encuentran orientaciones sobre los grupos de control positivo.	
Condiciones de alojamiento y alimentación		
T° en el local de los animales	22 °C ± 3 °C	
Humedad relativa	50-60 %, y no inferior al 30 % ni superior al 70 %	
Secuencia de iluminación diaria	12 horas de luz y 12 horas de oscuridad	
Dieta y agua de bebida	Ad libitum	

	Ratas	Ratonas
Alojamiento	Individualmente o en grupos de hasta tres animales (se recomienda el alojamiento en grupos sociales para los animales inmaduros)	
Dieta y cama	Bajo nivel de fitoestrógenos recomendado en la dieta y en la cama	
Protocolo		
Método	Método con hembras inmaduras no ovariectomizadas (método preferido) Método con hembras adultas ovariectomizadas	Método con hembras adultas ovariectomizadas
Edad a la que se administra la sustancia a los animales inmaduros	DPN 18 como pronto. La administración debe estar terminada antes del DPN 25.	No pertinente en el ámbito de aplicación del presente método de ensayo
Edad a la que se efectúa la ovariectomía	Entre 6 y 8 semanas de edad	
Edad a la que se administra la sustancia a los animales ovariectomizados	Deben pasar al menos 14 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración.	Deben pasar al menos 7 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración.
Peso corporal	La variación del peso corporal debe ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio.	
Administración de la sustancia		
Vía de administración	Vía oral forzada o inyección subcutánea	
Frecuencia de la administración	Una sola dosis diaria	
Volumen administrado por vía oral forzada o por inyección	$\leq 5\text{ml/kg}$ peso corporal (o hasta 10ml/kg peso corporal en caso de soluciones acuosas) (en 2 lugares de inyección si se utiliza la vía subcutánea)	
Duración de la administración	3 días consecutivos con animales inmaduros Mínimo de 3 días consecutivos con animales ovx	Mínimo de 7 días consecutivos con animales ovx
Momento de la autopsia	Unas 24 horas desde la administración de la última dosis	
Resultados		
Respuesta positiva	Aumento estadísticamente significativo del peso medio del útero (húmedo y/o seco)	
Estrógeno de referencia	17 α -etinil-estradiol	

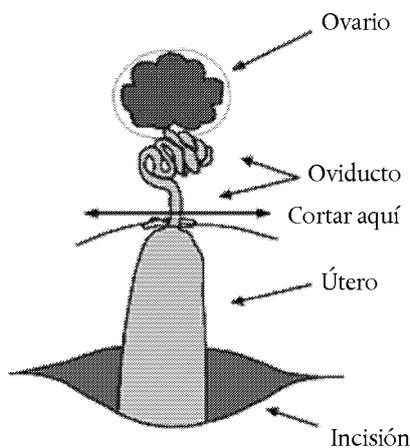
ORIENTACIÓN PARA LA INTERPRETACIÓN Y LA ACEPTACIÓN DE LOS RESULTADOS

54. En general, debe considerarse que un ensayo de estrogenicidad es positivo si en él se ve un aumento estadísticamente significativo del peso uterino ($p < 0,05$), al menos con la dosis más elevada, comparando con el grupo de control del disolvente. El resultado positivo se ve respaldado también por la demostración de una relación verosímil desde el punto de vista biológico entre la dosis y la magnitud de la respuesta, teniendo en cuenta que el solapamiento de las actividades estrogénicas y antiestrogénicas de la sustancia problema puede afectar a la forma de la curva dosis-respuesta.
55. Debe tenerse cuidado de no sobrepasar la dosis máxima tolerada, para que se pueda hacer una interpretación significativa de los datos. A este respecto, deben evaluarse a fondo la eventual reducción del peso corporal, la presencia de signos clínicos y otras observaciones.

56. Una consideración importante para la aceptación de los datos del bioensayo uterotrófico es la de los pesos uterinos del grupo de control del vehículo. Unos elevados valores del control pueden comprometer la sensibilidad del bioensayo y su capacidad de detectar agonistas estrogénicos muy débiles. Del análisis de la bibliografía y de los datos obtenidos durante la validación del bioensayo uterotrófico se deduce que hay casos espontáneos de medias elevadas en los controles, sobre todo en animales inmaduros (2)(3)(6)(9). Como el peso uterino de las ratas inmaduras depende de muchas variables, como la cepa o el peso corporal, no puede indicarse ningún límite superior definitivo para este peso. A modo de guía, si los pesos uterinos secos de las ratas de control inmaduras están comprendidos entre 40 y 45 mg, los resultados deben considerarse sospechosos y unos pesos uterinos superiores a 45 mg pueden justificar que se repita el ensayo. Sin embargo, esto debe estudiarse caso por caso (3)(6)(8). Cuando se utilizan ratas adultas, si la ovariectomía es incompleta quedará tejido ovárico que puede producir estrógenos endógenos y frenar el retroceso del peso uterino.
57. Se ha visto que se obtienen resultados aceptables con unos pesos uterinos secos del control del vehículo inferiores al 0,09 % del peso corporal en el caso de las ratas inmaduras e inferiores al 0,04 % en el de las adultas jóvenes ovariectomizadas [véase el cuadro 31 (2)]. Si los pesos uterinos del control son superiores a estas cifras, deberían examinarse diversos factores, como la edad de los animales, la calidad de la ovariectomía, la presencia de fitoestrógenos en la dieta, etc., y habría que considerar con precaución un resultado del ensayo negativo (sin indicación de actividad estrogénica).
58. Deben mantenerse en el laboratorio los datos históricos de los grupos de control del vehículo. También deben conservarse en el laboratorio los datos históricos de las respuestas a estrógenos positivos de referencia, tales como el 17 α -etil-estradiol. Los laboratorios pueden ensayar también la respuesta a agonistas estrogénicos débiles conocidos. Todos estos datos pueden compararse con los datos disponibles (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), con el fin de asegurarse de que los métodos del laboratorio ofrecen la suficiente sensibilidad.
59. En el estudio de validación de la OCDE, los pesos uterinos secos han mostrado menos variabilidad que los pesos uterinos húmedos (6)(7). Sin embargo, una respuesta significativa en alguna de las dos medidas indicaría que la sustancia problema es positiva para la actividad estrogénica.
60. La respuesta uterotrófica no es únicamente de origen estrogénico; no obstante, un resultado positivo del bioensayo uterotrófico debe interpretarse generalmente como prueba de potencial estrogénico *in vivo*, y debe lanzar en principio el procedimiento para aclarar la situación (véase el punto 9 y el "Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos", anexo 2).

Figura 1

Diagrama esquemático de la extracción quirúrgica de los ovarios



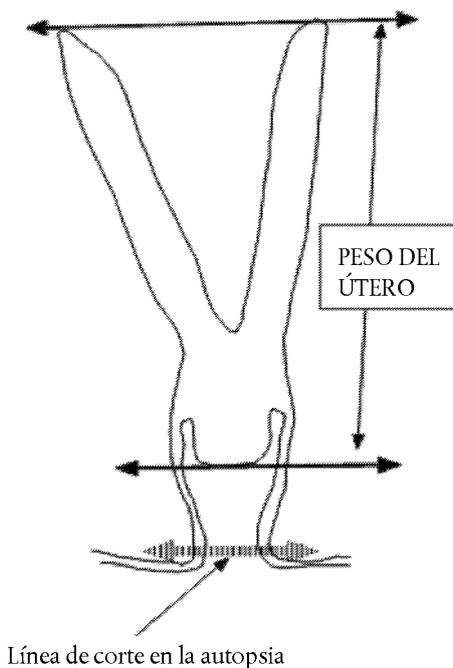
No se indican el mesometrio, los vasos sanguíneos ni el cuerpo adiposo.

El procedimiento se inicia con la apertura de la pared abdominal dorso-lateral en el punto medio entre el reborde costal inferior y la cresta ilíaca, y a unos pocos milímetros del borde lateral del músculo lumbar. Dentro de la cavidad abdominal, hay que localizar los ovarios. En un campo aséptico, a continuación se extraen los ovarios físicamente de la cavidad abdominal, se hace una ligadura entre el ovario y el útero para detener la hemorragia, y se

separa el ovario mediante incisión por encima de la ligadura en la unión entre el oviducto y cada cuerno uterino. Tras confirmar que no persiste ninguna hemorragia significativa, la pared abdominal se cierra mediante sutura y la piel mediante autoclips o sutura adecuada, por ejemplo. Debe dejarse un mínimo de 14 días antes de utilizar los animales, para que puedan recuperarse de la operación y que retroceda el peso de los úteros.

Figura 2

Separación y preparación de los tejidos uterinos para el pesaje



El procedimiento comienza con la apertura de la pared abdominal al nivel de la sínfisis púbica. A continuación, cada uno de los ovarios, si están presentes, y los cuernos uterinos se desprenden de la pared abdominal dorsal. La vejiga urinaria y los uréteres se separan de las caras ventral y lateral del útero y de la vagina. Se desprenden las adherencias fibrosas entre el recto y la vagina hasta que pueda identificarse la unión del orificio vaginal con la piel perineal. El útero y la vagina se desprenden del cuerpo cortando la pared vaginal justo por encima de la unión con la piel perineal como se muestra en la figura. El útero debe separarse del cuerpo cortando delicadamente el mesenterio uterino en el punto de su inserción a lo largo de toda la longitud de la cara dorsolateral de cada cuerno uterino. Una vez desprendido el útero del organismo, se retira el exceso de grasa y de tejido conjuntivo. Si están presentes, los ovarios se retiran a la altura de los oviductos evitando la pérdida de líquido luminal por el cuerno uterino. Si el animal ha sido ovariectomizado, hay que examinar los muñones para detectar la posible presencia de algún tejido ovárico. La vagina se retira del útero justo por debajo del cuello uterino, de forma que este siga unido al cuerpo del útero, como se indica en la figura. En ese momento puede pesarse el útero.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Antiestrogenicidad: Capacidad de una sustancia de suprimir la acción del 17 β -estradiol en un mamífero.

Sustancia: Sustancia o mezcla

Fecha de nacimiento: Día postnatal 0.

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

Dosis: Cantidad de sustancia problema administrada. Para el bioensayo uterotrófico, la dosis se expresa en peso de sustancia problema por unidad de peso corporal del animal sometido al experimento por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal/día).

Dosis máxima tolerable (DMT): La mayor cantidad de una sustancia que, cuando se introduce en el organismo, no mata a los animales de experimentación (indicada con la sigla DL₀) (IUPAC 1993).

Estrogenicidad: Capacidad de una sustancia de actuar como el 17 β -estradiol en un mamífero.

Día postnatal X: Día n^o X de vida a partir de la fecha de nacimiento.

Sensibilidad: Proporción de todas las sustancias activas/positivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados inequívocos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo.

Especificidad: Proporción de todas las sustancias inactivas/negativas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados inequívocos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo.

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

Uterotrófico: Término utilizado para describir un efecto positivo sobre el crecimiento de los tejidos uterinos.

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

Note: Document prepared by the Secretariat of the Test Guidelines Programme based on the agreement reached at the 6th Meeting of the EDTA Task Force

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

<p>Level 1 Sorting & prioritization based upon existing information</p>	<ul style="list-style-type: none"> — physical & chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability, — human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns — hazard, e.g., available toxicological data 	
<p>Level 2 <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<ul style="list-style-type: none"> — ER, AR, TR receptor binding affinity — Transcriptional activation — Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i> — Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding — QSARs 	<ul style="list-style-type: none"> — High Through Put Prescreens — Thyroid function — Fish hepatocyte VTG assay — Others (as appropriate)
<p>Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine Mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Uterotrophic assay (estrogenic related) — Hershberger assay (androgenic related) — Non -receptor mediated hormone function — Others (e.g. thyroid) 	<ul style="list-style-type: none"> — Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)
<p>Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine Mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> — enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms) — male and female pubertal assays — adult intact male assay 	<ul style="list-style-type: none"> — Fish gonadal histopathology assay — Frog metamorphosis assay
<p>Level 5 <i>In vivo</i> assays providing data on effects from endocrine & other mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> — 1-generation assay (TG415 enhanced)¹ — 2-generation assay (TG416 enhanced)¹ — reproductive screening test (TG421 enhanced)¹ — combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)¹ <p>¹ Potential enhancements will be considered by VMG mamm</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates (developmental and reproduction)

VMG mamm: Grupo de gestión de la validación de ensayos con mamíferos y su evaluación

NOTAS RELATIVAS AL MARCO CONCEPTUAL

- Nota 1.* Es posible entrar en el marco y dejarlo en cualquier nivel, en función de la naturaleza de la información que se necesite para la evaluación del peligro y del riesgo.
- Nota 2.* En el nivel 5, la ecotoxicología debe incluir parámetros que indiquen los mecanismos de los efectos adversos y los posibles daños a la población.
- Nota 3.* Cuando un modelo multimodal cubre varios ensayos de un mismo parámetro, este modelo puede sustituir a los ensayos individuales de ese parámetro.
- Nota 4.* La evaluación de cada sustancia debe hacerse caso por caso, teniendo en cuenta toda la información disponible, sin olvidar la función de cada uno de los niveles del marco conceptual.
- Nota 5.* No debe considerarse que el marco conceptual sea exhaustivo en el momento actual. En los niveles 3, 4 y 5 se incluyen ensayos que están disponibles o cuya validación está en curso. Con respecto a estos últimos, su inclusión tiene carácter provisional. Una vez desarrollados y validados, se inscribirán oficialmente en el marco conceptual.
- Nota 6.* No debe considerarse que el nivel 5 incluya solo ensayos definitivos. Se considera que los ensayos incluidos en este nivel contribuyen a la evaluación general del peligro y del riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OCDE (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. *Crit. Rev. Toxicol.* 32:445-520.
- (4) OCDE (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay-Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. *Environ Health Perspect.* 109:785-94.
- (6) OCDE (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2-Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two-Dose Response Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two Coded Single Dose Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. *Environ. Health Persp.* 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. *Endocrinology* 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127:10-15.

- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OCDE (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320-333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33-41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288-305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- (31) OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development-Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization.* Nueva York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OCDE (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

B.55. BIOENSAYO DE HERSHBERGER CON RATAS: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES (ANTI)ANDRÓGENICAS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 441 (2009). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos (1). Uno de los elementos de la actividad consistía en elaborar unas directrices para el bioensayo de Hershberger con ratas. Este ensayo, después de haberse utilizado durante varias décadas en el sector farmacéutico, fue normalizado por primera vez en 1962 por un comité de expertos oficiales, como herramienta para el cribado de sustancias androgénicas (2). Entre 2001 y 2007, el bioensayo de Hershberger con ratas ha sido objeto de un amplio programa de validación, que incluía la elaboración de un documento de revisión de referencia (23), la recopilación de un documento detallado sobre métodos (3), la elaboración de una guía sobre disección (21) y la realización de extensos estudios intra e interlaboratorios para mostrar la fiabilidad y la reproducibilidad del bioensayo. Estos estudios de validación se llevaron a cabo con un potente andrógeno de referencia [propionato de testosterona (PT)], dos potentes andrógenos sintéticos (acetato de trembolona y metil-testosterona), un potente medicamento antiandrogénico (flutamida), un potente inhibidor (finasterida) de la síntesis del andrógeno natural dihidrotestosterona (DHT), varios plaguicidas débilmente antiandrogénicos (linurón, vinclozolina, procimidona, p,p'-DDE), un potente inhibidor de la 5 α -reductasa (finasterida) y dos sustancias negativas conocidas (dinitrofenol y nonilfenol) (4)(5)(6)(7)(8). El presente método de ensayo es el resultado de la larga experiencia histórica con el bioensayo y de la experiencia adquirida durante el programa de validación, así como de los resultados obtenidos en este.
2. El bioensayo de Hershberger es un ensayo de cribado a corto plazo *in vivo* que utiliza tejidos secundarios del aparato reproductor masculino. El ensayo surgió en la década de 1930 y se modificó en la de 1940 para incluir músculos del aparato reproductor masculino sensibles a los andrógenos (2)(9-15). En la década de 1960 se evaluaron más de 700 posibles andrógenos utilizando una versión normalizada del protocolo (2)(14), y en esa misma década se consideró utilizar el ensayo como un método normalizado para estudiar tanto andrógenos como antiandrógenos (2)(15). El bioensayo actual se basa en los cambios de peso de cinco tejidos de ratas macho castradas peripuberales, tejidos que son sensibles a los andrógenos. Evalúa la capacidad de una sustancia para provocar actividades biológicas características de agonistas o antagonistas androgénicos, o de inhibidores de la 5 α -reductasa. Los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos que se incluyen en el presente método de ensayo son la próstata ventral (PV), la vesícula seminal (VS) (con los líquidos y las glándulas coagulantes), el músculo elevador del ano con el músculo bulbocavernoso (EABC), la pareja de glándulas de Cowper (GCW) y el glande del pene (GP). En las ratas macho castradas peripuberales, estos cinco tejidos responden a los andrógenos con un aumento del peso absoluto. Cuando estos mismos tejidos se estimulan para incrementar su peso mediante la administración de un andrógeno potente de referencia, estos cinco tejidos responden a los antiandrógenos con una disminución de su peso absoluto. El modelo primario para el bioensayo de Hershberger es el macho peripuberal castrado quirúrgicamente, que se validó en las fases 1, 2 y 3 del programa de validación de Hershberger.
3. Este bioensayo de Hershberger sirve de ensayo de cribado del mecanismo *in vivo* de agonistas y antagonistas androgénicos y de inhibidores de la 5 α -reductasa, y su aplicación debe considerarse en el contexto del "OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) (apéndice 2). En este marco conceptual el bioensayo de Hershberger figura en el nivel 3 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre un solo mecanismo endocrino, es decir, la (anti)androgenicidad. Se pretende incluir este bioensayo en una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para identificar las sustancias con potencial para interactuar con el sistema endocrino, lo que desembocará finalmente en evaluaciones del peligro y del riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

4. Debido a las preocupaciones que implica la castración sobre el bienestar de los animales, se buscó un modelo alternativo para el bioensayo de Hershberger con machos intactos (sin castrar) destetados estimulados, a fin de evitar la fase de castración. Se validó el método de ensayo con animales destetados estimulados (24); sin embargo, en los estudios de validación no se vio que la versión del bioensayo de Hershberger con estos animales destetados pudiera detectar sistemáticamente los efectos que tienen, sobre el peso de los órganos sensibles a los andrógenos, las sustancias antiandrogénicas débiles a las dosis estudiadas. Por lo tanto, no se incluye en el presente método de ensayo. Sin embargo, reconociendo que su uso no solo puede mejorar el bienestar de los animales, sino también ofrecer información sobre otros modos de acción, se encuentra en el documento de orientación de la OCDE 115 (25).

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. Los agonistas y antagonistas androgénicos actúan como ligandos del receptor androgénico y pueden activar o inhibir, respectivamente, la transcripción de genes controlada por el receptor. Además, algunas sustancias inhiben la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona, que es un andrógeno natural más potente, en algunos tejidos diana de los andrógenos (inhibidores de la 5 α -reductasa). Estas sustancias pueden provocar peligros para la salud, incluidos ciertos efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Por lo tanto, desde el punto de vista de la normativa es necesario evaluar con rapidez las sustancias que puedan ser agonistas o antagonistas androgénicos o inhibidores de la 5 α -reductasa. Aunque de carácter informativo, la afinidad de un ligando por un receptor androgénico, medida por la unión al receptor o por la activación transcripcional de genes marcadores *in vitro*, no es el único factor determinante de un posible peligro. Otros factores determinantes son la activación y desactivación metabólica de la sustancia al entrar en el organismo, su distribución en los tejidos diana, y su eliminación del organismo. Esto lleva a la necesidad de detectar la posible actividad de una sustancia *in vivo* en las condiciones y exposición relevantes. La evaluación *in vivo* es menos crítica si se conocen las características de la sustancia en cuanto a su absorción — distribución — metabolismo — eliminación (ADME). Los tejidos sensibles a los andrógenos responden con un rápido y vigoroso crecimiento cuando se estimulan con andrógenos, especialmente en las ratas macho castradas peripuberales. Diversas especies de roedores, especialmente la rata, se utilizan también ampliamente en estudios de toxicidad para la caracterización de los peligros. Por consiguiente, la versión del ensayo que utiliza ratas peripuberales castradas y los cinco tejidos diana es adecuada para el cribado *in vivo* de los agonistas y antagonistas androgénicos y de los inhibidores de la 5 α -reductasa.
6. El presente método de ensayo se basa en los protocolos empleados en el estudio de validación de la OCDE que han demostrado ser fiables y reproducibles en estudios intra e interlaboratorios (4)(5)(6)(7)(8). En el presente método de ensayo se recogen procedimientos para sustancias tanto androgénicas como antiandrogénicas.
7. Aunque ha habido cierta variación en la dosis de PT utilizada, para detectar antiandrógenos en el programa de validación del bioensayo de Hershberger de la OCDE, por los diferentes laboratorios (0,2 frente a 0,4 mg/kg/día, en inyección subcutánea), se ha encontrado poca diferencia entre estas dos variantes del protocolo en cuanto a la capacidad de detectar una actividad antiandrogénica débil o fuerte. Sin embargo, es evidente que la dosis de PT no ha de ser tan alta como para bloquear los efectos de los antagonistas débiles del receptor androgénico (RA) ni tan baja como para que los tejidos androgénicos tengan una respuesta de escaso crecimiento incluso sin la administración conjunta de un antiandrógeno.
8. La respuesta de crecimiento de los distintos tejidos sensibles a los andrógenos no es únicamente de origen androgénico, es decir, ciertas sustancias que no son agonistas androgénicos pueden alterar el peso de determinados tejidos. Sin embargo, una respuesta de crecimiento de varios tejidos de forma concomitante avala que se trata de un mecanismo androgénico más específico. Por ejemplo, con dosis elevadas de estrógenos potentes se puede aumentar el peso de las vesículas seminales; sin embargo, los demás tejidos sensibles a los andrógenos utilizados en el ensayo no responden de forma similar. Las sustancias antiandrogénicas pueden actuar bien como antagonistas del receptor androgénico o bien como inhibidores de la 5 α -reductasa. Los inhibidores de la 5 α -reductasa tienen un efecto variable, ya que la conversión en dihidrotestosterona, más potente, varía según el tejido. Los antiandrógenos que inhiben la 5 α — reductasa, como la finasterida, tienen efectos más pronunciados en la próstata ventral que en los otros tejidos, en comparación con un antagonista potente del RA, como la flutamida. Esta diferencia en la respuesta según los tejidos puede aprovecharse para distinguir entre los modos de acción mediados por el RA y los mediados por la 5 α — reductasa. Además, el receptor androgénico está relacionado evolutivamente con el de otras hormonas esteroideas, y algunas otras hormonas, si se administran a dosis altas, suprafisiológicas, pueden unirse a los receptores y antagonizar los efectos de aumento del crecimiento del PT (13). Además, también es verosímil que un aumento del metabolismo de los esteroides y el consiguiente descenso de la testosterona presente en el suero reduzcan el crecimiento de los tejidos sensibles a los andrógenos. Por tanto, un eventual resultado positivo en el bioensayo de Hershberger debe evaluarse normalmente aplicando un planteamiento de ponderación de las pruebas, con inclusión de ensayos *in vitro*, tales como los ensayos de unión alRAy a los receptores estrogénicos (RE) y los correspondientes ensayos de activación de la transcripción, o con otros ensayos *in vivo* que examinen tejidos diana androgénicos similares, tales como el ensayo sobre la pubertad con machos, el ensayo con machos adultos intactos de 15 días, o los estudios con administración continuada de 28 o de 90 días.

9. La experiencia indica que los andrógenos xenobióticos son más raros que los antiandrógenos xenobióticos. Puede esperarse, pues, que el bioensayo de Hershberger se utilice con más frecuencia para el cribado de antiandrógenos. No obstante, el procedimiento de ensayo de andrógenos podría recomendarse para sustancias esteroideas o similares, o para sustancias de las cuales se haya deducido una indicación de posibles efectos androgénicos con los métodos que figuran en los niveles 1 o 2 del marco conceptual (apéndice 2). Del mismo modo, en los ensayos de nivel 5 se pueden observar efectos adversos asociados con perfiles (anti)androgénicos, lo que hace necesario evaluar si una sustancia actúa siguiendo un modo de acción endocrino.
10. Se acepta que todos los procedimientos en los que se utilicen animales deben atenerse a las normas locales de tratamiento de animales; las descripciones de tratamiento y atención de animales recogidas más adelante constituyen requisitos mínimos de comportamiento, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (26). La OCDE proporciona más orientaciones sobre el tratamiento compasivo de los animales (17).
11. Como en cualquier bioensayo con animales de experimentación, debe prestarse una atención especial a la necesidad de llevar a cabo el estudio. Básicamente, puede haber dos motivos para tomar una decisión de ese tipo:
 - un elevado potencial de exposición (nivel 1 del marco conceptual) o indicios de (anti)androgenicidad en ensayos *in vitro* (nivel 2) que avalen la realización de investigaciones sobre si estos efectos pueden producirse *in vivo*;
 - efectos concordantes con (anti)androgenicidad en ensayos *in vivo* de los niveles 4 o 5 que avalen la realización de investigaciones sobre el modo de acción específico, por ejemplo para determinar si los efectos se deben a una mecanismo (anti)androgénico.
12. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

13. El bioensayo de Hershberger consigue su sensibilidad utilizando machos con una producción mínima de andrógenos endógenos. Esto se logra mediante el uso de machos castrados, siempre que se deje pasar un plazo razonable tras la castración para que los tejidos diana puedan retroceder a un peso de referencia mínimo y uniforme. De esta manera, cuando se efectúa un cribado de la posible actividad androgénica, se encuentran bajos niveles endógenos de andrógenos circulantes, que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es incapaz de compensar por mecanismos de retroalimentación, se maximiza la capacidad de los tejidos para responder, y se minimiza la variabilidad del peso inicial de los tejidos. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad antiandrogénica, puede lograrse un aumento más sistemático del peso de los tejidos a la hora de estimularlos con un andrógeno de referencia. En consecuencia, el bioensayo de Hershberger exige solo 6 animales por grupo de dosis, mientras que en otros ensayos con machos púberes o adultos intactos se requiere la utilización de 15 animales por grupo de dosis.
14. La castración de las ratas machos peripuberales debe realizarse de manera adecuada, utilizando anestesia y un procedimiento aséptico. Deben administrarse analgésicos en los primeros días tras la operación para eliminar las molestias posquirúrgicas. La castración mejora la precisión del ensayo para detectar andrógenos y antiandrógenos débiles al eliminar los mecanismos compensatorios de retroalimentación endocrina presentes en los animales intactos que pueden atenuar los efectos de los andrógenos y antiandrógenos administrados, y al eliminar la gran variabilidad interindividual de los niveles de testosterona en suero. Por lo tanto, la castración reduce el número de animales necesarios para el cribado de estas actividades endocrinas.
15. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad androgénica, la sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o por inyección subcutánea durante un período de diez días consecutivos. Las sustancias problema se administran a un mínimo de dos grupos de tratamiento de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo. Tras unas 24 horas después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Un aumento estadísticamente significativo en el peso de dos o más órganos diana de los grupos a los que se ha administrado la sustancia problema en comparación con el grupo de control del vehículo indica que dicha sustancia es positiva en cuanto a una posible actividad androgénica (véase el punto 60). Los andrógenos, como la trembolona, que no pueden reducirse en 5 α tienen efectos más pronunciados en el EABC y el GP en comparación con el PT, pero todos los tejidos deben mostrar un aumento del crecimiento.
16. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad antiandrogénica, la sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o por inyección subcutánea durante un período de diez días consecutivos, a la vez que se administran por inyección subcutánea dosis diarias de PT (0,2 o 0,4 mg/kg/d). En el programa de validación se

determinó que podía utilizarse tanto una dosis de 0,2 como de 0,4 mg/kg/d de PT, ya que ambas eran eficaces para la detección de antiandrógenos, por lo que solo debía seleccionarse una dosis para el ensayo. La sustancia problema se administra en dosis graduadas a un mínimo de tres grupos de tratamiento de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo. Tras unas 24 horas después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Un descenso estadísticamente significativo en el peso de dos o más órganos diana de los grupos a los que se ha administrado la sustancia problema más el PT en comparación con el grupo de control al que solo se ha administrado el PT indica que dicha sustancia es positiva en cuanto a una posible actividad antiandrogénica (véase el punto 61).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de especies y cepas

17. La rata es la especie utilizada sistemáticamente en el bioensayo de Hershberger desde la década de 1930. Aunque es biológicamente verosímil que tanto la rata como el ratón muestren respuestas similares, tras la experiencia de 70 años con el modelo de la rata se puede afirmar que esta es la especie preferida para el bioensayo de Hershberger. Además, como los datos del bioensayo de Hershberger pueden servir de datos preliminares para un estudio multigeneracional a largo plazo, es posible utilizar en ambos estudios animales de la misma especie, cepa y origen.
18. El presente protocolo permite a los laboratorios seleccionar la cepa de rata que vaya a utilizarse en el ensayo y que, por lo general, debe ser la utilizada habitualmente por el laboratorio participante. Pueden utilizarse cepas de rata de uso común en laboratorios; sin embargo, no deben utilizarse cepas que tarden bastante más de 42 días en madurar, ya que la castración de estos machos a los 42 días puede impedir el pesaje del glándulo del pene, que solo puede llevarse a cabo después de que el prepucio se haya separado del cuerpo del pene. Así pues, no deben utilizarse cepas de rata derivadas de la Fisher 344, salvo en casos especiales. La rata Fisher 344 tiene un calendario de desarrollo sexual diferente del de otras cepas utilizadas habitualmente, como son la Sprague Dawley o la Wistar (16). Si va a utilizarse dicha cepa, el laboratorio debe castrar los animales a una edad levemente superior y ha de poder demostrar la sensibilidad de la cepa empleada. El laboratorio debe indicar claramente las razones que justifiquen la elección de la cepa de rata. Cuando el ensayo de cribado pueda utilizarse como preliminar para un estudio de la toxicidad oral con administración continuada, para un estudio de la toxicidad para la reproducción y el desarrollo, o para un estudio a largo plazo, deberán utilizarse preferentemente en todos los estudios animales de la misma cepa y del mismo origen.

Condiciones de alojamiento y alimentación

19. Todos los procedimientos deben atenerse a todas las normas locales de tratamiento de animales de laboratorio. Estas descripciones de tratamiento y atención de animales constituyen los requisitos mínimos, y quedan anuladas por normas locales de carácter más estricto, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (26). El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (con una oscilación aproximada de ± 3 °C). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y de preferencia no exceder del 70 %, salvo durante la limpieza del local. El objetivo debe ser conseguir una humedad relativa del 50-60 %. La iluminación debe ser artificial. La secuencia diaria de iluminación debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
20. El alojamiento en grupo es preferible al aislamiento, debido a la corta edad de los animales y al hecho de que las ratas son animales sociales. El alojamiento de dos o tres animales por jaula evita el hacinamiento y el estrés que este conlleva y que pueden interferir con el control hormonal del desarrollo de los tejidos sexuales secundarios. Las jaulas deben limpiarse a fondo para eliminar los posibles contaminantes presentes y se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Con unas jaulas del tamaño adecuado ($\sim 2\ 000\ \text{cm}^2$) se evitará el hacinamiento.
21. Cada animal debe identificarse inequívocamente (por ejemplo, etiqueta o marca auricular) utilizando un método incruento. Debe consignarse el método de identificación.
22. Debe darse una dieta de laboratorio y agua de bebida *ad libitum*. Los laboratorios que efectúen el bioensayo de Hershberger deben utilizar la dieta que apliquen normalmente en sus tareas de ensayo de sustancias. En los estudios de validación del bioensayo no se observaron efectos ni variabilidad que pudieran atribuirse a la dieta. Se registrará la dieta utilizada y se conservará una muestra de la dieta de laboratorio para posibles futuros análisis.

Criterios de comportamiento en relación con el peso de los órganos sensibles a los andrógenos

23. Durante el estudio de validación, no se encontraron indicios de que una disminución del peso corporal afectara incrementando o disminuyendo el aumento del peso de los tejidos diana (es decir, los que deben pesarse en este estudio).

24. Entre las diferentes cepas de rata utilizadas con éxito en el programa de validación, el peso de los órganos sensibles a los andrógenos es mayor en las cepas de rata más pesadas que en las más ligeras. Por tanto, los criterios de comportamiento del bioensayo de Hershberger no incluyen ningún valor absoluto previsto del peso de los órganos de los controles positivos ni de los negativos.
25. Como el coeficiente de variación (CV) de un tejido tiene una relación inversa con la potencia estadística, los criterios de comportamiento del bioensayo de Hershberger se basan en unos valores máximos del CV de cada tejido (cuadro 1). Los CV proceden de los estudios de validación de la OCDE. En caso de resultados negativos, los laboratorios deben examinar los CV del grupo de control y del grupo tratado con la dosis más elevada para determinar si se ha respetado el criterio de comportamiento relativo al CV máximo.
26. El estudio deberá repetirse cuando: 1) tres o más de los diez posibles CV individuales de los grupos de control y de dosis más elevada superen los máximos indicados para los estudios de agonistas y de antagonistas en el cuadro 1, y 2) al menos dos tejidos diana hayan sido marginalmente significativos, es decir, con valores r entre 0,05 y 0,10.

Cuadro 1

CV máximos autorizados para los tejidos sexuales secundarios diana, determinados con el modelo de ratas castradas en los estudios de validación de la OCDE ⁽¹⁾.

Tejido	Efectos antiandrogénicos	Efectos androgénicos
Vesículas seminales	40 %	40 %
Próstata ventral	40 %	45 %
EABC	20 %	30 %
Glándulas de Cowper	35 %	55 %
Glande del pene	17 %	22 %

PROCEDIMIENTO

Cumplimiento de la normativa y verificación del laboratorio

27. A diferencia del ensayo uterotrófico (capítulo B.54 del presente anexo), con el bioensayo de Hershberger no es necesario demostrar la competencia del laboratorio antes del inicio del estudio, ya que se llevan a cabo, como parte integrante del ensayo, controles concurrentes positivos (propionato de testosterona y flutamida) y negativos.

Número y estado de los animales

28. Cada grupo tratado y de control debe incluir un mínimo de 6 animales. Esto se aplica a los protocolos tanto con andrógenos como con antiandrógenos.

Castración

29. Debe dejarse un período de aclimatación inicial de varios días tras la recepción de los animales a fin de garantizar que estos están sanos y se desarrollan bien. Como es posible que los animales castrados antes de tener 42 días de edad, es decir, antes del día postnatal (DPN) 42, no presenten la separación del prepucio, hay que castrar a los animales el DPN 42 o después, pero no antes. Los animales se castran bajo anestesia haciendo una incisión en el escroto y eliminando ambos testículos y epidídimos, con ligadura de los vasos sanguíneos y de los conductos seminíferos. Tras confirmar que no se está produciendo ninguna hemorragia, ha de cerrarse el escroto con sutura o con autoclips. Durante los primeros días después de la operación, deben administrarse a los animales analgésicos para paliar las molestias debidas a la misma. Si los animales castrados se adquieren de un proveedor de animales, este debe garantizar la edad de los animales y su fase de madurez sexual.

⁽¹⁾ El CV umbral para un determinado tejido se obtuvo a partir de un gráfico de valores de CV —ordenados de menor a mayor de forma secuencial— de todas las medias de todos los experimentos del ejercicio de validación con un modelo específico (agonista o antagonista). El CV umbral se lee en el punto en que los incrementos entre los CV siguientes más elevados de la serie son mucho más grandes que entre los CV anteriores más próximos, es decir, en el “punto de ruptura”. Cabe señalar que, aunque este análisis identificó “puntos de ruptura” relativamente fiables en el caso del modelo del ensayo para antagonistas, las curvas de CV en el ensayo para agonistas mostraron un aumento más uniforme, por lo que la identificación de un CV umbral por este método tiene algo de arbitrario en el último caso.

Aclimatación tras la castración

30. Los animales deben continuar la aclimatación a las condiciones del laboratorio para que retrocedan los pesos de los tejidos diana, durante un mínimo de 7 días a partir de la castración. Es preciso observar a diario a los animales, y deben suprimirse los animales que presenten signos de enfermedad o anomalías físicas. Por tanto, el tratamiento con la sustancia problema puede comenzar como muy pronto el día DPN 49, y como muy tarde el DPN 60. La edad a la que se efectúa la autopsia no debe superar el DPN 70. Esta flexibilidad permite al laboratorio programar con eficacia las tareas experimentales.

Peso corporal y aleatorización de los grupos

31. Las diferencias en el peso corporal de los distintos animales son una fuente de variabilidad de los pesos de los tejidos, tanto dentro de cada grupo como entre los distintos grupos de animales. El aumento de la variabilidad del peso de los tejidos provoca un aumento del coeficiente de variación (CV) y disminuye la potencia estadística del ensayo (a veces denominada sensibilidad del ensayo). Por consiguiente, las variaciones de peso corporal deben estar controladas, tanto de manera experimental como estadística.
32. El control experimental implica que sean pequeñas las variaciones del peso corporal dentro de los grupos de estudio y entre ellos. En primer lugar, deben evitarse los animales excepcionalmente grandes o pequeños y no incluirlos en la cohorte del estudio. Al inicio del estudio, la variación de peso de los animales empleados no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio (por ejemplo, $175\text{g} \pm 35\text{g}$ en el caso de las ratas peripuberales castradas). En segundo lugar, los animales deben asignarse a los grupos (tanto de control como de tratamiento) mediante distribución aleatorizada de los pesos, de forma que la media del peso corporal de cada grupo no sea estadísticamente diferente de la de los demás grupos. Debe consignarse debidamente el procedimiento de aleatorización por bloques utilizado.
33. Debido a que la toxicidad puede reducir el peso corporal de los grupos tratados en relación con el grupo de control, puede emplearse como covariable estadística el peso corporal en el primer día de la administración de la sustancia problema, en lugar del peso corporal en el momento de la autopsia.

Posología

34. Con el fin de establecer si una sustancia problema puede tener acción androgénica *in vivo*, normalmente es suficiente con dos grupos tratados con dicha sustancia y un grupo de control positivo y otro de control negativo (vehículo) (véase el punto 43), por lo que este diseño es el preferido por razones de bienestar de los animales. Si la finalidad es obtener una curva dosis-respuesta o bien extrapolar a dosis más bajas, son necesarios al menos tres grupos tratados. Si hace falta obtener información más allá de la identificación de una actividad androgénica (tal como una estimación de la potencia), debe considerarse una posología diferente. Para hacer un ensayo de antiandrogénos, se administra la sustancia problema junto con un agonista androgénico de referencia. Debe utilizarse un mínimo de 3 grupos de ensayo con dosis diferentes de la sustancia problema, y un control positivo y otro negativo (véase el punto 44). A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia problema, el grupo de control debe recibir el mayor volumen de vehículo utilizado con los grupos de ensayo.
35. Todas las dosis deben proponerse y seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia problema o productos afines. La dosis más alta debe tener en cuenta, en primer lugar, la DL_{50} y la información disponible sobre la toxicidad aguda, a fin de evitar la muerte, el sufrimiento intenso o el malestar de los animales (17)(18)(19)(20) y, en segundo lugar, la información disponible sobre las dosis utilizadas en los estudios de toxicidad crónica y subcrónica. En general, la dosis más alta no debe provocar una reducción del peso corporal final de los animales mayor del 10% del peso de control. La dosis más alta debe ser o bien 1) la dosis más alta que garantice la supervivencia de los animales y que no implique toxicidad significativa ni malestar para los animales después de 10 días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis máxima de $1\ 000\text{ mg/kg/d}$ (véase el punto 36), o bien 2) una dosis que induzca efectos (anti)androgénicos, si esta es inferior. Como ensayo de cribado, es aceptable en general utilizar grandes intervalos entre las distintas dosis, como, por ejemplo, de media unidad logarítmica, correspondiente a un factor de progresión de las dosis de 3,2, o incluso de una unidad logarítmica. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de determinación de la gama de dosis (véase el punto 37), con el fin de ayudar a determinar las dosis convenientes.

Dosis límite

36. Si mediante un ensayo con la dosis límite de $1\ 000\text{ mg/kg}$ de peso corporal al día y con una dosis menor utilizando los procedimientos descritos para el presente estudio no se consigue provocar un cambio estadísticamente significativo del peso de los órganos genitales, puede considerarse que no hace falta aplicar otras dosis diferentes. La dosis límite es aplicable siempre, excepto cuando haya datos de exposición humana que indiquen la necesidad de utilizar una dosis superior.

Consideraciones para la determinación de la gama de dosis

37. En caso de necesidad, puede llevarse a cabo con unos pocos animales un estudio previo de determinación de la gama de dosis, a fin de seleccionar los grupos de dosis adecuados [utilizando los métodos de ensayo de la toxicidad aguda (capítulos B.1 bis, B.1 tris del presente anexo (27), OCDE TG 425 (19))]. El objetivo en el caso del bioensayo de Hershberger es seleccionar las dosis que garanticen la supervivencia y que no impliquen toxicidad significativa ni malestar para los animales después de diez días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis límite de 1 000 mg/kg/d como se indica en los puntos 35 y 36. A este respecto, puede utilizarse el documento de orientación de la OCDE (17), donde se definen los signos clínicos indicativos de toxicidad o de malestar de los animales. Cuando sea posible en este estudio de determinación de la gama de dosis, tras administrar la sustancia durante diez días, pueden extraerse los tejidos diana y pesarse, una vez hayan transcurrido unas 24 horas desde la administración de la última dosis. Estos datos podrían utilizarse posteriormente para contribuir a la selección de las dosis del estudio principal.

Sustancias de referencia y vehículo

38. El agonista androgénico de referencia debe ser el propionato de testosterona (PT), nº CAS 57-82-5. La dosis de referencia del PT puede ser o bien 0,2 mg/kg-pc/d o bien 0,4 mg/kg-pc/d. El antagonista androgénico de referencia debe ser la flutamida (FT), nº CAS 1311-84-7. La dosis de referencia de la FT debe ser 3 mg/kg-pc/d y la FT debe administrarse conjuntamente con la dosis de referencia del PT.
39. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de una solución o suspensión acuosa. Sin embargo, dado que muchos ligandos androgénicos o sus precursores metabólicos tienden a ser hidrófobos, el enfoque más común es el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz, de cacahuete, de sésamo o de oliva). Las sustancias problema pueden disolverse en una cantidad mínima de etanol al 95 % u otro disolvente adecuado, y diluirse en el vehículo del ensayo hasta alcanzar las concentraciones finales de trabajo. Deben conocerse las características tóxicas del disolvente, y este debe someterse a ensayo por separado, en un grupo de control al que se administre solo el disolvente. Si la sustancia problema se considera estable, es posible recurrir a un calentamiento suave y a una acción mecánica vigorosa para ayudar a disolverla. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Si la sustancia problema es estable a lo largo de todo el estudio, puede prepararse una sola alícuota inicial de ella, y después preparar cada día las diluciones especificadas para la administración, con cuidado para evitar la contaminación y el deterioro de las muestras.

Administración de las dosis

40. El PT debe administrarse por inyección subcutánea, y la FT por vía oral forzada.
41. La sustancia problema se administra por vía oral forzada o por inyección subcutánea. A la hora de elegir la vía de administración debe considerarse el bienestar de los animales y las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema. Además, deben tenerse en cuenta aspectos toxicológicos como la pertinencia para la vía de exposición humana a la sustancia (por ejemplo, vía oral forzada para simular la ingestión, inyección subcutánea para simular la inhalación o la adsorción cutánea), y la información toxicológica disponible y los datos sobre metabolismo y cinética (por ejemplo, necesidad de evitar el metabolismo de primer paso, mayor eficacia a través de una vía concreta), antes de iniciar amplios ensayos a largo plazo si se obtienen resultados positivos por inyección.
42. Los animales deben recibir las dosis de la misma manera y con la misma secuencia temporal durante diez días consecutivos, con unos intervalos aproximados de 24 horas. El nivel de dosis debe ajustarse diariamente sobre la base de las medidas diarias del peso corporal tomadas de forma paralela. El volumen de las dosis y el momento en que se administren deben registrarse cada día de la exposición. Debe tenerse cuidado de no sobrepasar la dosis máxima descrita en el punto 35, para que se pueda hacer una interpretación significativa de los datos. A este respecto, deben evaluarse a fondo una eventual reducción de peso corporal, la presencia de signos clínicos y otras observaciones. En el caso de la vía oral forzada, debe utilizarse una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Deben seguirse las normas locales de tratamiento de animales, pero el volumen no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, con las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal. En el caso de las inyecciones subcutáneas, las dosis deben administrarse en las regiones dorsoescapular o lumbar con una aguja estéril (por ejemplo, de calibre de 23 o 25 G) y una jeringuilla de tuberculina. Es opcional rasurar el lugar de la inyección. Deben registrarse los eventuales vertidos, las fugas en el punto de inyección o la administración incompleta de la sustancia problema. El volumen total inyectado por rata al día no debe superar los 0,5 ml/kg de peso corporal.

Procedimientos específicos para los agonistas androgénicos

43. Para el ensayo de agonistas androgénicos, el vehículo es el control negativo y el grupo tratado con PT es el control positivo. La actividad biológica característica de los agonistas androgénicos se somete a ensayo administrando las dosis seleccionadas de la sustancia problema a los grupos de tratamiento durante 10 días consecutivos. Los pesos de los cinco tejidos sexuales secundarios de los grupos a los que se administra la sustancia problema se comparan con los del grupo del vehículo para detectar un eventual aumento estadísticamente significativo del peso.

Procedimientos específicos para los antagonistas androgénicos y para los inhibidores de la 5 α -reductasa

44. En el ensayo de antagonistas androgénicos y de inhibidores de la 5 α -reductasa, el grupo tratado con PT es el control negativo, y el grupo al que se administran conjuntamente las dosis de referencia de PT y de FT es el control positivo. La actividad biológica característica de los antagonistas androgénicos y de los inhibidores de la 5 α -reductasa se somete a ensayo administrando una dosis de referencia de PT y la sustancia problema durante 10 días consecutivos. Los pesos de los cinco tejidos sexuales secundarios de los grupos a los que se administra el PT más la sustancia problema se comparan con los del grupo de referencia al que se administra solo el PT para detectar un eventual descenso estadísticamente significativo del peso.

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

45. Deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con más frecuencia si se aprecian signos de toxicidad. Las observaciones deben llevarse a cabo preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período previsto de efecto máximo tras la administración. Todos los animales deben observarse para registrar su mortalidad y morbilidad y los signos clínicos generales, tales como cambios en el comportamiento, la piel, el pelo, los ojos, las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones, y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.).
46. Todos los animales hallados muertos deben retirarse y eliminarse sin más análisis de los datos. La eventual mortalidad de los animales antes de la autopsia debe incluirse en el registro del estudio, junto con los motivos aparentes de la mortalidad. Los animales moribundos deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales que se encuentren moribundos y se sacrifiquen posteriormente deben incluirse en el registro del estudio con los motivos aparentes de la morbilidad.

Peso corporal y consumo de alimentos

47. Todos los animales deben pesarse diariamente con precisión de 0,1 g, empezando justo antes de que se inicie el tratamiento, es decir, cuando los animales se asignan a los grupos. Con carácter optativo, es posible medir por jaula la cantidad de alimentos consumidos durante el período del tratamiento, pesando los alimentadores. Los resultados del consumo de alimentos deben expresarse en gramos por rata y por día.

Disección y pesaje de los tejidos y órganos

48. Aproximadamente 24 horas después de la última administración de la sustancia problema, las ratas deben sacrificarse y desangrarse según los procedimientos normales del laboratorio correspondiente, y debe efectuarse la autopsia. El método de sacrificio compasivo debe registrarse en el informe del laboratorio.
49. Lo ideal es que el orden de la autopsia se aleatorice entre los distintos grupos para evitar una progresión directa de los grupos de más dosis a los de menos (o viceversa), que podría afectar a los datos. Debe registrarse y comunicarse cualquier observación que se haga en la autopsia, es decir, las eventuales alteraciones patológicas o lesiones visibles.
50. Han de pesarse los cinco tejidos sensibles a los andrógenos (PV, VS, EABC, GCW, GP). Estos tejidos deben extraerse y limpiarse cuidadosamente retirando el exceso de tejidos y de grasa adheridos; a continuación se determina su peso fresco (sin fijar). Cada tejido debe manipularse con especial cuidado para evitar la pérdida de líquidos y la desecación, que pueden introducir errores significativos y aumentar la variabilidad al reducir los pesos registrados. Algunos de los tejidos pueden ser muy pequeños o difíciles de extraer, lo que aumenta

la variabilidad. Por lo tanto, es importante que las personas que lleven a cabo la disección de los tejidos sexuales secundarios estén familiarizadas con los procedimientos normalizados de esta disección. La OCDE ha publicado un manual de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para la disección (21). Una formación cuidadosa, siguiendo la guía de PNT, reducirá al mínimo esta fuente potencial de variación del estudio. Idealmente, el mismo disector debe encargarse de la disección de un determinado tejido para eliminar las diferencias interindividuales en el tratamiento de los tejidos. Si esto no es posible, la autopsia debe diseñarse de manera que cada disector extraiga un determinado tejido de todos los grupos de tratamiento, en lugar de que una sola persona extraiga todos los tejidos de un grupo de control, mientras que otra persona se encarga de los grupos tratados. Cada uno de los tejidos sexuales secundarios debe pesarse, sin secarse previamente, con precisión de 0,1 mg, y se registran los pesos de cada animal.

51. Algunos de los tejidos pueden ser muy pequeños o difíciles de extraer, lo que aumenta la variabilidad. En trabajos anteriores se ha indicado una banda de coeficientes de variación (CV) que parece diferir según la competencia del laboratorio. En unos pocos casos, se han observado dentro de un mismo laboratorio grandes diferencias en el peso absoluto de tejidos como la PV y las GCW.
52. También pueden pesarse, con carácter opcional, el hígado, la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales. También estos órganos se deben limpiar para quedar libres del eventual tejido conjuntivo y de la grasa adheridos. El hígado debe pesarse y el resultado registrarse con precisión de 0,1 g, y la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales con precisión de 0,1 mg. El hígado, los riñones y las cápsulas suprarrenales son sensibles no solo a los andrógenos, sino que también proporcionan indicios útiles sobre la toxicidad sistémica.
53. Es opcional la medición de la concentración en el suero de la hormona luteinizante (LH), de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la testosterona (T). Los niveles de T en suero son útiles para determinar si la sustancia problema activa el metabolismo hepático de la testosterona, lo que reduciría dichos niveles. Sin los datos de la T, podría parecer que este efecto se debe a un mecanismo antiandrogénico. Los niveles de LH proporcionan información sobre la capacidad de una sustancia antiandrogénica no solo de reducir el peso de los órganos, sino también de afectar a la función hipotalámico-hipofisaria, lo que en estudios a largo plazo puede inducir tumores de testículo. La FSH es una hormona importante para la espermatogénesis. La medición de los niveles en suero de T4 y T3 también es opcional y aporta información suplementaria útil sobre la capacidad de alterar la homeostasis de la hormona tiroidea. Si se van a medir los niveles hormonales, las ratas deben anestesiarse antes de la autopsia y se les toma sangre por punción cardíaca; el método de la anestesia debe seleccionarse con cuidado para que no afecte a la medición hormonal. Deben registrarse el método de preparación del suero, el origen del equipo del radioinmunoanálisis o de otros equipos de medición, los métodos analíticos y los resultados. Los niveles de LH deben indicarse en ng/ml de suero, y la T también debe indicarse en las mismas unidades.
54. La disección de los tejidos se describe a continuación, y se basa en una guía de disección pormenorizada con fotografías, publicada como material suplementario incluido en el programa de validación (21). En la página web del organismo oficial de alimentos y medicamentos de Corea se encuentra también un vídeo sobre la disección (22).
 - Con la superficie ventral del animal hacia arriba, se determina si el prepucio se ha separado del glande del pene. En caso positivo, se retrae el prepucio y se extrae el glande del pene, se pesa (con precisión de 0,1 mg) y se registra el peso.
 - Se abren la piel y la pared abdominal, exponiendo las vísceras. Si se pesan los órganos opcionales, se extrae el hígado y se pesa con precisión de 0,1 g, se extraen el estómago y los intestinos, se extraen la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales y se pesan con precisión de 0,1 mg. Esta extracción deja expuesta la vejiga y permite la disección de los tejidos secundarios masculinos diana.
 - Para extraer la PV, hay que separar la vejiga de la capa muscular ventral cortando el tejido conjuntivo a lo largo de la línea media. Se desplaza la vejiga hacia adelante, en el sentido de las vesículas seminales (VS), lo que deja a la vista los lóbulos izquierdo y derecho de la próstata ventral (cubiertos por una capa de grasa). Se separa cuidadosamente la grasa de los lóbulos derecho e izquierdo de la PV. Se desplaza suavemente el lóbulo derecho de la PV respecto a la uretra y se separa de esta mediante un corte. Sosteniendo aún el lóbulo derecho de la PV, se desplaza suavemente el lóbulo izquierdo respecto a la uretra y luego se separa mediante un corte; pesar con precisión de 0,1 mg y registrar el peso.
 - Para extraer la vesícula seminal con las glándulas coagulantes (VSGC), se desplaza la vejiga hacia la cola, dejando así a la vista los conductos deferentes y los lóbulos derecho e izquierdo de las vesículas seminales más las glándulas coagulantes. Para evitar fugas de líquido se fija una pinza hemostática en la base de la VSGC, donde el conducto deferente se une a la uretra. Se extrae cuidadosamente la VSGC, sin retirar la pinza hemostática se limpia de la grasa y de los elementos anejos, se coloca en una navecilla de pesaje ya tarada, se quita la pinza, se pesa con precisión de 0,1 mg y se registra el peso.

- Para extraer el músculo elevador del ano más el músculo bulbocavernoso (EABC), se exponen estos músculos y la base del pene. Los músculos EA envuelven el colon, mientras que los músculos EA anterior y BC se fijan a los bulbos del pene. Se eliminan la piel y los elementos anejos de la región perianal que va desde la base del pene hasta el extremo anterior del ano. Los músculos BC se van cortando gradualmente a partir del bulbo del pene y de los demás tejidos. El colon se corta en dos y así puede diseccionarse y extraerse el conjunto de los EABC. Los EABC deben limpiarse de la grasa y elementos anejos y pesarse con precisión de 0,1 mg; el peso se registra.
 - Después de haberse retirado los EABC, pueden verse las glándulas de Cowper redondas o glándulas bulbouretrales (GCW), en la base de los bulbos del pene, en posición ligeramente dorsal. Es necesario prestar atención en la disección para no cortar la fina cápsula y evitar así que se escape el líquido contenido. Pesar la pareja de GCW con precisión de 0,1 mg y registrar el peso.
 - Además, debe indicarse si se escapa algún líquido de cualquier glándula durante la autopsia y disección.
55. En caso de que la evaluación de cada sustancia requiera la autopsia de más animales de lo que sea razonable para un solo día, el inicio del estudio podrá escalonarse en dos días consecutivos, con lo que se conseguirá escalonar en dos días la autopsia y el trabajo correspondiente. Al aplicar este escalonamiento, hay que usar cada día la mitad de los animales por grupo de tratamiento.
56. Los cadáveres deben eliminarse de manera adecuada tras la realización de la autopsia.

INFORME DEL ENSAYO

Datos

57. Los datos deben notificarse individualmente (es decir, el peso corporal, el peso de los tejidos sexuales secundarios, las mediciones opcionales y las otras respuestas y observaciones) y por cada grupo de animales (las medias y desviaciones típicas de cada medida). Los datos deben resumirse en forma de cuadro y deben indicar el número de animales al comienzo del ensayo, el de los animales encontrados muertos durante el ensayo o encontrados con signos de toxicidad, la descripción de los signos de toxicidad, así como el momento de aparición, la duración y la gravedad.
58. El informe final debe contener lo siguiente:

Instalaciones de ensayo

- Nombre de la instalación y ubicación
- Director y demás personal del estudio, con sus responsabilidades en el mismo
- Fechas de inicio y final del estudio, es decir, el primer día de la administración de la sustancia problema y el último día de la autopsia, respectivamente

Sustancia problema

- Origen, número de lote, identidad, pureza, dirección completa del proveedor y caracterización de la sustancia o sustancias problema
- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas
- Condiciones de almacenamiento y método y frecuencia de la preparación de las diluciones
- Eventuales datos obtenidos sobre la estabilidad
- Eventuales análisis de las soluciones o suspensiones administradas

Vehículo

- Caracterización del vehículo (identidad, proveedor y número de lote)
- Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua)

Animales de ensayo y procedimientos de cría de los animales

- Especie y cepa utilizadas y justificación de la elección
- Origen o proveedor de los animales, con la dirección completa
- Número y edad de los animales proporcionados

- Condiciones de alojamiento (temperatura, iluminación, etc.)
- Dieta (denominación, tipo, proveedor, número de lote, contenido, y, si se conocen, niveles de fitoestrógenos)
- Camas (denominación, tipo, proveedor y contenido)
- Condiciones de alojamiento en las jaulas y número de animales de cada jaula.

Condiciones del ensayo

- Edad de los animales en el momento de la castración y duración de la aclimatación una vez castrados
- Peso de cada animal al inicio del estudio (con precisión de 0,1 g)
- Proceso de aleatorización y registro de la asignación a los grupos (de control del vehículo, de referencia, de tratamiento con la sustancia problema) y a las jaulas
- MEDIA y desviación típica de los pesos corporales de cada grupo en cada día de pesaje a lo largo de todo el estudio
- Justificación de la selección de las dosis
- Vía de administración de la sustancia problema y justificación de la elección de la vía de exposición
- Si se trata de un ensayo de antiandrogenicidad, el tratamiento con PT (dosis y volumen)
- Tratamiento con la sustancia problema (dosis y volumen),
- Momento de la administración
- Procedimientos de autopsia, incluidos los medios del desangrado y la eventual anestesia
- Si se efectúan análisis de suero, deben proporcionarse detalles del método. Por ejemplo, si se utiliza el radioinmunoanálisis (RIA), deben recogerse en el informe el procedimiento de RIA, el origen y la fecha de caducidad de los equipos de RIA, el procedimiento para el recuento de centelleo, y la normalización.

Resultados

- Observaciones diarias de cada animal durante la administración, incluido lo siguiente:
- Pesos corporales (con precisión de 0,1 g)
- Signos clínicos (en su caso)
- Eventual medición o notas del consumo de alimentos
- Observaciones de la autopsia de cada animal, en particular:
- Fecha de la autopsia
- Grupo de tratamiento de los animales
- Código de identificación del animal
- Disector
- Hora del día en que se realizan la autopsia y la disección
- Edad de los animales
- Peso corporal final en la autopsia, con indicación de los eventuales aumentos o disminuciones estadísticamente significativos
- Orden del sangrado y de la disección de los animales en la autopsia
- Pesos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos:
- Próstata ventral (con precisión de 0,1 mg)
- Vesículas seminales más glándulas coagulantes, incluidos los líquidos (por parejas, con precisión de 0,1 mg)
- Complejo de músculos elevador del ano y bulbocavernoso (con precisión de 0,1 mg)
- Glándulas de Cowper (peso fresco — por parejas, con precisión de 0,1 mg)
- Glante del pene (peso fresco, con precisión de 0,1 mg)

- Pesos de los tejidos opcionales, si se determinan:
- Hígado (con precisión de 0,1 g)
- Riñones (por parejas, con precisión de 0,1 mg)
- Cápsulas suprarrenales (por parejas, con precisión de 0,1 mg)
- Observaciones generales y comentarios
- Análisis de las hormonas en el suero, si se efectúa:
 - LH en suero (opcional — ng por ml de suero), y
 - T en suero (opcional — ng por ml de suero)
- Observaciones generales y comentarios

Resumen de los datos

Los datos deben resumirse en forma de cuadro con el tamaño de la muestra de cada grupo, la media del valor, y el error estándar de la media o la desviación típica. Los cuadros deben incluir los pesos corporales en el momento de la autopsia, los cambios de peso corporal desde el inicio de la administración de la sustancia hasta la autopsia, los pesos de los tejidos sexuales secundarios diana, y los eventuales pesos de órganos opcionales.

Discusión de los resultados

Análisis de los resultados

59. Los pesos corporales y de los órganos en el momento de la autopsia deben analizarse estadísticamente en relación con características tales como la homogeneidad de la varianza, con las adecuadas transformaciones de datos que puedan ser necesarias. Los grupos de tratamiento deben compararse con un grupo de control, utilizando técnicas tales como la ANOVA, y a continuación deben realizarse comparaciones por parejas (por ejemplo, la prueba unilateral de Dunnett) y aplicarse el criterio de diferencia estadística, por ejemplo, $p \leq 0,05$. Deben señalarse los grupos que alcancen significación estadística. Sin embargo, deben evitarse los pesos “relativos de órganos”, debido a las hipótesis estadísticas inválidas en que se basa esta manipulación de datos.
60. En el caso de los agonistas androgénicos, el control debe ser el grupo de ensayo del vehículo solo. Las características del modo de acción de una sustancia problema pueden dar lugar a diferentes respuestas relativas según los tejidos; por ejemplo, la trembolona, que no puede sufrir la reducción 5-alfa, tiene efectos más pronunciados sobre los EABC y el GP que el PT. Un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en los pesos de al menos dos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos (PV, EABC, GP, GCW y VSGC) debe considerarse como resultado positivo de acción agonista androgénica, y todos los tejidos diana deben presentar algún grado de aumento del crecimiento. Puede conseguirse una evaluación combinada de todas las respuestas de los tejidos de los órganos sexuales secundarios mediante el adecuado análisis de datos con múltiples variables. Esto podría mejorar el análisis, sobre todo en los casos en que es un único tejido el que da una respuesta estadísticamente significativa.
61. En el caso de los antagonistas androgénicos, el control debe ser el grupo de ensayo del andrógeno de referencia (propionato de testosterona solo). Las características del modo de acción de una sustancia problema pueden dar lugar a diferentes respuestas relativas según los tejidos; por ejemplo, los inhibidores de la 5-alfa-reductasa, como la finasterida, tienen efectos más pronunciados sobre la próstata ventral que sobre otros tejidos, en comparación con antagonistas potentes de los RA, como la flutamida. Una reducción estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en los pesos de al menos dos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos (PV, EABC, GP, GCW y VSGC) en comparación con el tratamiento solo con PT debe considerarse como resultado positivo de acción antagonista androgénica, y todos los tejidos diana deben presentar algún grado de reducción del crecimiento. Puede conseguirse una evaluación combinada de todas las respuestas de los tejidos de los órganos sexuales secundarios mediante el adecuado análisis de datos con múltiples variables. Esto podría mejorar el análisis, sobre todo en los casos en que es un único tejido el que da una respuesta estadísticamente significativa.
62. Los datos deben resumirse en forma de cuadro con la media, el error estándar de la media (también podría aceptarse la desviación típica) y el tamaño de la muestra de cada grupo. También deben incluirse cuadros con los datos individuales. Deben examinarse los valores individuales y los valores de la media, el error estándar (o desviación típica) y los CV de los datos de los controles para determinar si cumplen los criterios aceptables de coherencia con los valores históricos previstos. En caso de que los CV hallados superen los valores de los CV del cuadro 1 (véanse los puntos 25 y 26) relativos a los pesos de los distintos órganos, hay que determinar si hay errores en el registro o en la introducción de los datos, o si el laboratorio no domina aún la disección con precisión de los tejidos sensibles a los andrógenos por lo que sería necesario mejorar la formación o práctica. Generalmente, los CV (la desviación típica dividida por el peso medio del órgano) son reproducibles de un laboratorio a otro,

y de un estudio a otro. Los datos presentados deben incluir al menos: los pesos de la próstata ventral, de las vesículas seminales, de los músculos elevador del ano y bulbocavernoso, de las glándulas de Cowper, del glande del pene y del hígado, los pesos corporales y la variación del peso corporal desde el inicio de la administración de la sustancia hasta la autopsia. Los datos también pueden presentarse después de haber ajustado la covarianza en función del peso corporal, pero ello no debe sustituir a la presentación de los datos sin ajustar. Además, si no se produce la separación del prepucio en alguno de los grupos, la incidencia de esta separación debe registrarse y compararse estadísticamente con respecto al grupo de control, utilizando la prueba exacta de Fisher.

63. Al verificar la exactitud de los datos introducidos en el ordenador respecto a las fichas originales de datos, es necesario examinar atentamente los valores de peso de los órganos que no sean biológicamente verosímiles o se separen en más de tres desviaciones típicas de las medias de los grupos de tratamiento, y es posible que tengan que desecharse tales valores, que probablemente sean errores de registro.
 64. La comparación de los resultados del estudio con los valores de CV de la OCDE (cuadro 1) suele ser un paso importante en la interpretación en cuanto a la validez de los resultados del estudio. Deben mantenerse en el laboratorio los datos históricos de los grupos de control del vehículo. También deben conservarse en el laboratorio los datos históricos de las respuestas a las sustancias positivas de referencia, tales como el PT y la FT. Los laboratorios pueden también someter a ensayo periódicamente la respuesta a agonistas y antagonistas androgénicos débiles conocidos y conservar esos datos. Dichos resultados pueden compararse con los datos disponibles de la OCDE para garantizar que los métodos del laboratorio proporcionan suficiente precisión y potencia estadísticas.
-

Apéndice 1

DEFINICIONES

Androgénico: Término utilizado para describir un efecto positivo sobre el crecimiento de los tejidos sensibles a los andrógenos.

Antiandrogenicidad: Capacidad de una sustancia de suprimir la acción del PT en un mamífero.

Sustancia: Sustancia o mezcla.

Fecha de nacimiento: Día postnatal 0.

Dosis: Cantidad de sustancia administrada. Para el bioensayo de Hershberger, la dosis se expresa en peso de sustancia problema por unidad de peso corporal del animal sometido al experimento por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal al día).

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

Moribundo: Término utilizado para describir a un animal que está a punto de morir.

Día postnatal X: Día nº X de vida a partir de la fecha de nacimiento.

Sensibilidad: Capacidad de un método de ensayo para identificar correctamente las sustancias que tienen la propiedad objeto del ensayo.

Especificidad: Capacidad de un método de ensayo para identificar correctamente las sustancias que no tienen la propiedad objeto del ensayo.

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

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

Nota: Documento preparado por la Secretaría del programa de directrices de ensayo sobre la base del acuerdo alcanzado en la 6ª reunión del grupo de trabajo sobre el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos

Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos

<p>Nivel 1 Clasificación y asignación de prioridades según la información existente</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Propiedades físicas y químicas; p. ej., PM, reactividad, volatilidad, biodegradabilidad — Exposición humana y ambiental; p. ej., volumen de producción, vertido, tipos de uso — Peligro; p. ej., datos toxicológicos disponibles 	
<p>Nivel 2 Ensayos <i>in vitro</i> que aporten datos sobre el mecanismo</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Afinidad de unión a receptores RE, RA, RT — Activación transcripcional — Aromatasa y esteroidogénesis <i>in vitro</i> — Reconocimiento/unión de receptores de hidrocarburos arílicos — QSARs 	<ul style="list-style-type: none"> — Cribados previos de alto rendimiento — Función tiroidea — Ensayo de VTG con hepatocitos de peces — Otros (según proceda)
<p>Nivel 3 Ensayos <i>in vivo</i> que aporten datos sobre mecanismos y efectos endocrinos únicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Ensayo uterotrófico (en relación con estrógenos) — Ensayo de Hershberger (en relación con andrógenos) — Función hormonal sin mediación de receptores — Otros (p. ej., tiroides) 	<ul style="list-style-type: none"> — Ensayo de VTG (vitelogenina) con peces (en relación con estrógenos)
<p>Nivel 4 Ensayos <i>in vivo</i> que aporten datos sobre mecanismos y efectos endocrinos múltiples</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Directrices de ensayo de la OCDE TG 407 mejoradas (parámetros basados en mecanismos endocrinos) — Ensayos con machos y hembras púberes — Ensayo con machos adultos intactos 	<ul style="list-style-type: none"> — Ensayo de histopatología gonadal con peces — Ensayo de metamorfosis de rana
<p>Nivel 5 Ensayos <i>in vivo</i> que aporten datos sobre efectos de mecanismos endocrinos y de otros tipos</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Ensayo de 1 generación (TG415 mejoradas) — Ensayo de 2 generaciones (TG416 mejoradas)¹ — Ensayo de cribado para la reproducción (TG421 mejoradas)¹ — Ensayo de cribado combinado 28 días/reproducción (TG 422 mejoradas)¹ <p>¹ El grupo VMG mamm considerará las posibles mejoras.</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Ensayos de ciclos de vida parciales y completos de peces, aves, anfibios e invertebrados (desarrollo y reproducción)

VMG mamm: Grupo de gestión de la validación de ensayos con mamíferos y su evaluación

NOTAS RELATIVAS AL MARCO CONCEPTUAL

- Nota 1.* Es posible entrar en el marco y dejarlo en cualquier nivel, en función de la naturaleza de la información que se necesita para la evaluación del peligro y del riesgo.
- Nota 2.* En el nivel 5, la ecotoxicología debe incluir parámetros que indiquen los mecanismos de los efectos adversos y los posibles daños a la población.
- Nota 3.* Cuando un modelo multimodal cubre varios ensayos de un mismo parámetro, este modelo puede sustituir a los ensayos individuales de ese parámetro.
- Nota 4.* La evaluación de cada sustancia debe hacerse caso por caso, teniendo en cuenta toda la información disponible, sin olvidar la función de los niveles del marco conceptual.
- Nota 5.* No debe considerarse que el marco conceptual sea exhaustivo en el momento actual. En los niveles 3, 4 y 5 se incluyen ensayos que están disponibles o cuya validación está en curso. Con respecto a estos últimos, su inclusión tiene carácter provisional. Una vez desarrollados y validados, se inscribirán oficialmente en el marco conceptual.
- Nota 6.* No debe considerarse que el nivel 5 incluya solo ensayos definitivos. Se considera que los ensayos incluidos en este nivel contribuyen a la evaluación general del peligro y del riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. En: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OCDE (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OCDE (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Fase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OCDE (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.

- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. En: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. Nueva York: Humana Press, p. 38.
- (17) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development-Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, París.
- (19) OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- (23) OCDE (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OCDE (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OCDE (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- (26) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.
- (27) Los capítulos siguientes del presente anexo:
 - B.1 bis. Toxicidad oral aguda. Método de dosis fijas
 - B.1 ter. Toxicidad oral aguda. Método de las clases de toxicidad aguda

B.56. ESTUDIO AMPLIADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 443 (2012). Se basa en la propuesta del comité técnico de evaluación de la seguridad de las sustancias utilizadas en la agricultura (ACSA), del Instituto de Ciencias de la Salud y el Medio ambiente (HESI), del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), en relación con un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación F₁ sobre distintas fases de la vida, publicado en Cooper *et al.*, 2006 (1). Se han aportado varias mejoras y aclaraciones al diseño del estudio a fin de darle flexibilidad y de hacer hincapié en la importancia de partir de los conocimientos existentes, utilizando al mismo tiempo las observaciones in vivo para orientar y adaptar los ensayos. El presente método de ensayo proporciona una descripción detallada de la realización de un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación. El método de ensayo describe tres cohortes de animales de la generación F₁:

Cohorte 1: evalúa parámetros de la reproducción/del desarrollo; esta cohorte puede ampliarse para abarcar una generación F₂.

Cohorte 2: evalúa el posible impacto de la exposición a la sustancia sobre el desarrollo del sistema nervioso.

Cohorte 3: evalúa el posible impacto de la exposición a la sustancia sobre el desarrollo del sistema inmunitario.

2. Las decisiones sobre si procede evaluar la segunda generación y omitir la cohorte de la neurotoxicidad para el desarrollo o la cohorte de la inmunotoxicidad para el desarrollo deben reflejar los conocimientos existentes sobre la sustancia que se va a evaluar, así como las necesidades derivadas de las diversas autoridades normativas. La finalidad del método de ensayo es proporcionar detalles sobre cómo puede realizarse el estudio y tratar sobre cómo hay que evaluar a cada cohorte.
3. En el documento de orientación de la OCDE 117 (39) se describe un procedimiento decisorio sobre el desencadenamiento interno del estudio de la 2ª generación, a la intención de las autoridades normativas que utilizan factores desencadenantes internos.

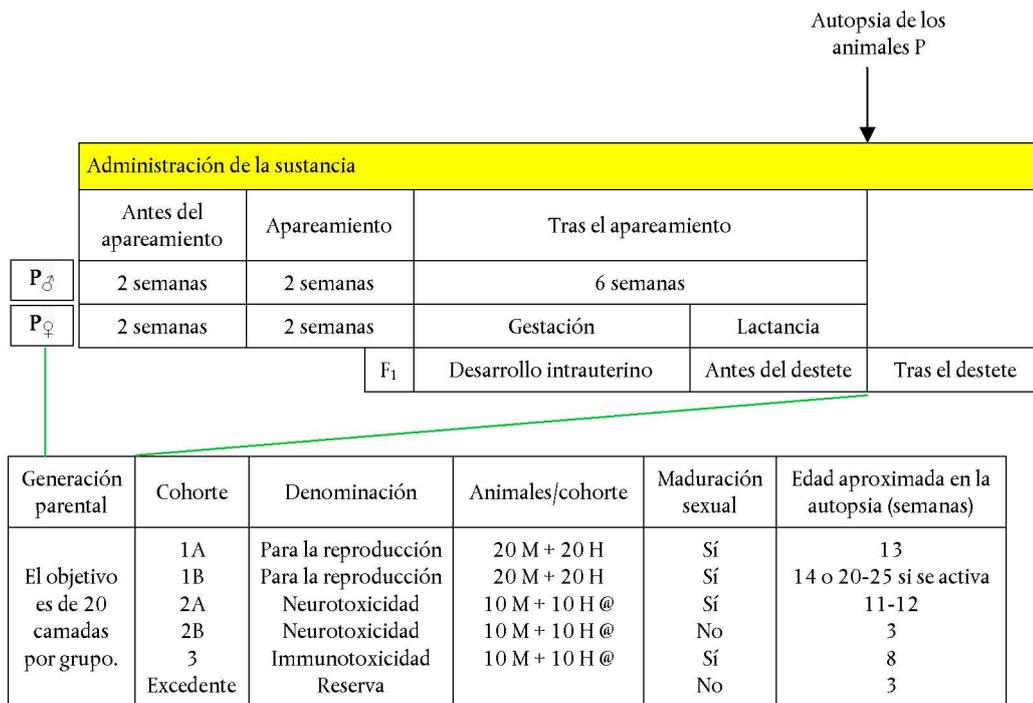
Consideraciones iniciales y objetivos

4. El objetivo principal del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación es evaluar ciertas fases de la vida no cubiertas por otros tipos de estudios de toxicidad y examinar los efectos que se pueden producir como consecuencia de una exposición pre y postnatal a la sustancia. Respecto a los parámetros reproductivos, se prevé que, para detectar los efectos sobre los órganos genitales de machos y hembras, se utilice, como primera etapa y en caso de disponibilidad, la eventual información derivada de estudios con administración continuada [incluidos los ensayos de cribado de la toxicidad para la reproducción, como las TG 422 de la OCDE (32)], o los ensayos de cribado de alteradores endocrinos a corto plazo (por ejemplo, el ensayo uterotrófico -método de ensayo B.54 (36), y el ensayo de Hershberger -método de ensayo B.55 (37). Esto podría incluir la espermatogénesis (histopatología testicular) en los machos y los ciclos estrales, los recuentos foliculares/maduración de ovocitos y la integridad de los ovarios (histopatología) en las hembras. El estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación sirve entonces como ensayo de parámetros reproductores que exigen la interacción de machos con hembras, de las hembras con los productos de la concepción, y de las hembras con la prole y la generación F_1 hasta después de la madurez sexual [véase el documento de orientación de la OCDE 151 en apoyo de este método de ensayo (40)].
5. El presente método de ensayo está diseñado con el objetivo de proporcionar una evaluación de los efectos pre y postnatales de las sustancias sobre el desarrollo, así como una evaluación completa de la toxicidad sistémica en las hembras gestantes y lactantes y en los descendientes jóvenes y adultos. Mediante el examen detallado de los principales parámetros del desarrollo, tales como la viabilidad de la descendencia, la salud neonatal, el grado de desarrollo al nacer y el desarrollo físico y funcional hasta la edad adulta, se espera poder identificar los órganos diana específicos de los descendientes. Además, el estudio debe facilitar o confirmar la información relativa a los efectos de la sustancia problema sobre la integridad y el comportamiento del aparato reproductor de los adultos, tanto machos como hembras. De forma específica, pero sin ánimo de exclusividad, se consideran los parámetros siguientes: función gonadal, ciclo estral, maduración del esperma epididimario, conducta de apareamiento, concepción, gestación, parto y lactancia. Además, la información obtenida de las evaluaciones de la neurotoxicidad para el desarrollo y de la inmunotoxicidad para el desarrollo permitirá caracterizar los efectos potenciales en esos sistemas. Los datos obtenidos de estos ensayos deben permitir la determinación de los niveles sin efectos adversos observados (NOAEL), de los niveles más bajos con efectos adversos observados (LOAEL) o de las dosis de referencia para los diversos parámetros, o utilizarse para caracterizar los efectos detectados en anteriores estudios con administración continuada o servir de orientación para ensayos posteriores.
6. En la figura 1 se muestra un esquema del protocolo. La sustancia problema se administra de manera continua en dosis graduadas a varios grupos de machos y hembras sexualmente maduros. Esta generación parental (P) recibe la sustancia durante un período determinado antes del apareamiento (seleccionado en función de la información disponible sobre la sustancia problema, pero de un mínimo de dos semanas) y durante dos semanas del período de apareamiento. Los machos P se siguen tratando por lo menos hasta el destete de la generación F_1 . El tiempo mínimo de tratamiento para ellos es de 10 semanas. Pueden tratarse durante más tiempo si es necesario para aclarar los efectos sobre la reproducción. El tratamiento de las hembras P continúa durante la gestación y lactancia hasta su sacrificio tras el destete de las camadas (es decir, 8-10 semanas de tratamiento). A los descendientes F_1 se les sigue administrando la sustancia problema desde el destete hasta la edad adulta. Si se evalúa una segunda generación [véase el documento de orientación de la OCDE 117 (39)], la descendencia F_1 se mantiene bajo tratamiento hasta el destete de la generación F_2 , o hasta la terminación del estudio.
7. Se someten todos los animales a observación clínica y examen patológico para detectar signos de toxicidad, insistentemente especialmente en los efectos sobre la integridad y el comportamiento del aparato reproductor de las hembras y de los machos, y sobre la salud, el crecimiento, el desarrollo y la actividad de los descendientes. En el momento del destete, se asignan los descendientes seleccionados a los distintos subgrupos (cohortes 1-3, véanse los puntos 33 y 34 y la figura 1) para efectuar más investigaciones, incluidas las relativas a la maduración sexual, la integridad y el funcionamiento de los órganos sexuales, los parámetros neurológicos y conductuales, y el funcionamiento del sistema inmunitario.
8. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación de la OCDE nº 19 sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (34).

9. Cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño de estudio, se revisará el método de ensayo y, en caso necesario, se modificará a la luz de la experiencia adquirida.

Figura 1

Esquema del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación



@ un animal por camada, con el total representativo de 20 camadas, cuando sea posible

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO/PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

Animales

Selección de la especie y de la cepa de los animales

10. La elección de la especie empleada en el ensayo de toxicidad para la reproducción tiene que considerarse con detenimiento a la vista de toda la información disponible. Sin embargo, debido a la amplitud de los datos previos y a la comparabilidad con los ensayos de toxicidad general, la rata es normalmente la especie preferida, y los criterios y recomendaciones formulados en el presente método de ensayo se refieren a esta especie. Si se utiliza otra especie, debe justificarse, y será necesario modificar el protocolo. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías espontáneas del desarrollo.

Edad, peso corporal y criterios de inclusión

11. Deben utilizarse animales parentales sanos, que no se hayan sometido a experimentos previos. Deben estudiarse tanto machos como hembras, y estas deben ser núlparas y no gestantes. Los animales P deben ser sexualmente maduros, de peso similar (dentro de cada sexo) al inicio de la administración, de edad similar (de unos 90 días) en el momento del apareamiento, y representativos de la especie y cepa estudiada. Los animales deben aclimatarse durante al menos 5 días después de su llegada. Se asignan aleatoriamente a los grupos de control y de tratamiento de forma que se obtengan unos valores similares de peso corporal medio de los grupos (es decir, con una desviación $\pm 20\%$ de la media).

Condiciones de alojamiento y alimentación

12. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe encontrarse entre el 30 y el 70 %, siendo ideal el intervalo del 50-60 %. La iluminación, artificial, debe fijarse

a una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Pueden utilizarse dietas convencionales de laboratorio junto con un aporte ilimitado de agua de bebida. Se debe prestar especial atención al contenido en fitoestrógenos de la dieta, ya que un nivel elevado de estos fitoestrógenos podría afectar a algunos parámetros de reproducción. Se recomienda utilizar dietas normalizadas, de composición abierta, en las que se haya reducido el contenido de sustancias estrogénicas (2)(30). La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método. Deben determinarse el contenido, la homogeneidad y la estabilidad de la sustancia problema en las dietas. La comida y el agua de bebida deben analizarse periódicamente para detectar la posible presencia de contaminantes. Deben conservarse en condiciones apropiadas (por ejemplo, congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) muestras de cada lote de la dieta empleada durante el estudio hasta la terminación del informe, por si acaso resultara necesario analizar de nuevo los ingredientes de la dieta.

13. Los animales se deben alojar en jaulas en pequeños grupos del mismo sexo y grupo de tratamiento. Pueden ser alojados individualmente, a fin de evitar posibles daños (por ejemplo, los machos después del período de apareamiento). El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobada la cópula, las hembras que se supone están gestantes se alojan por separado en jaulas de parto o de maternidad, donde se les aporta material de nidificación adecuado y definido. Las camadas se alojan con sus madres hasta el destete. Los animales F_1 deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo y grupo de tratamiento desde el destete hasta el sacrificio. Cuando esté científicamente justificado, los animales pueden alojarse individualmente. El nivel de fitoestrógenos contenido en el material de cama seleccionado debe ser mínimo.

Número e identificación de los animales

14. Normalmente, cada grupo de ensayo y de control debe contener un número suficiente de parejas para conseguir al menos 20 hembras gestantes por grupo de dosis. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones para garantizar una evaluación significativa del potencial de la sustancia problema para afectar a la fertilidad, gestación y comportamiento materno de la generación P, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes F_1 , desde la concepción hasta la madurez. El no conseguir el número deseado de hembras gestantes no invalida necesariamente el estudio y cada caso debe valorarse individualmente, teniendo en cuenta una posible relación causal con la sustancia problema.
15. A cada animal P se le asigna un número de identificación único antes de que se inicie la administración de la sustancia. Si los datos históricos del laboratorio indican la posibilidad de que una proporción significativa de las hembras no presente ciclos estrales regulares (de 4 o 5 días), se aconseja efectuar una evaluación de los ciclos estrales antes del comienzo del tratamiento. También se puede aumentar el tamaño de los grupos para asegurarse de que al menos 20 hembras de cada grupo tienen ciclos estrales regulares (de 4 o 5 días) al inicio del tratamiento. Todos los descendientes F_1 se identifican inequívocamente cuando se examinan los neonatos por primera vez el día postnatal (DPN) 0 o 1. A lo largo de todo el estudio debe mantenerse un registro donde se indique la camada de origen de todos los animales de la generación F_1 , y de la F_2 en su caso.

Sustancia problema

Información disponible sobre la sustancia problema

16. El examen de la información existente es importante para tomar decisiones sobre la vía de administración, la elección del vehículo, la selección de la especie animal, la selección de las dosis y las posibles modificaciones del calendario de administración. Por lo tanto, al diseñar el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación debe tomarse en consideración toda la información disponible sobre la sustancia problema, es decir, sobre sus propiedades fisicoquímicas, toxicocinéticas (incluido el metabolismo específico de la especie) y toxicodinámicas, las relaciones estructura-actividad, los procesos metabólicos *in vitro*, los resultados de anteriores estudios de toxicidad y la información pertinente sobre análogos estructurales. Puede obtenerse información preliminar sobre absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) y bioacumulación a partir de la estructura química, los datos fisicoquímicos, el grado de unión a proteínas plasmáticas o los estudios toxicocinéticos (TC), mientras que los resultados de los estudios de toxicidad dan información adicional, por ejemplo, sobre el NOAEL, el metabolismo o la inducción metabólica.

Consideración de los datos toxicocinéticos

17. Aunque no sean obligatorios, los datos TC de los estudios de determinación de la gama de dosis o de otro tipo llevados a cabo previamente son muy útiles para la planificación del diseño del estudio, la selección de las dosis y la interpretación de los resultados. De especial utilidad son los datos que: 1) verifican la exposición de los fetos y crías en desarrollo a la sustancia problema (o a sus metabolitos pertinentes), 2) proporcionan una estimación de

la dosimetría interna, y 3) evalúan el potencial de saturación de los procesos cinéticos en función de la dosis. También debe prestarse atención a los datos toxicocinéticos adicionales de que se disponga, tales como perfiles de metabolitos, evolución de la concentración a lo largo del tiempo, etc. Asimismo, pueden recogerse datos toxicocinéticos adicionales durante el estudio principal, siempre que ello no interfiera con la recogida e interpretación de los parámetros principales de dicho estudio.

Como orientación de carácter general, los siguientes conjuntos de datos toxicocinéticos pueden ser útiles en la planificación del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación:

- Sangre materna y sangre fetal al final de la gestación (por ejemplo, en el día de gestación 20)
- Sangre materna, sangre de las crías y/o leche a mediados del período de lactancia (DPN 10)
- Muestras de sangre de los animales destetados al poco tiempo del destete (por ejemplo, DPN 28).

Debe aplicarse cierta flexibilidad para la determinación de los analitos específicos (por ejemplo, sustancia madre o sus metabolitos) y para el programa de muestreo. Por ejemplo, el número y la hora de la recogida de las muestras en un determinado día de muestreo dependerán de la vía de exposición y del conocimiento previo de las propiedades toxicocinéticas de los animales no gestantes. En el caso de los estudios que implican administración con los alimentos, una única muestra tomada a la misma hora cada día puede ser suficiente, mientras que si la administración se hace por vía oral forzada puede estar justificado el muestreo en momentos adicionales para obtener una mejor estimación de la gama de dosis internas. Sin embargo, no es necesario generar una curva completa de concentración-tiempo para cada día de muestreo. En caso necesario, se puede agrupar la sangre por sexos dentro de las camadas para los análisis fetales y neonatales.

Vía de administración

18. La selección de la vía debe tener en cuenta la vía o vías más pertinentes para la exposición humana. Aunque el protocolo está diseñado para la administración de la sustancia problema con la dieta, puede modificarse para contemplar la administración por otras vías (agua de bebida, vía oral forzada, inhalación, a través de la piel) en función de las características de la sustancia y de la información requerida.

Elección del vehículo

19. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, y solo después el de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz). Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Debe evitarse la utilización de vehículos con potencial de toxicidad intrínseca (por ejemplo, acetona, DMSO). Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Debe prestarse atención a las siguientes características si se utiliza un vehículo u otro aditivo para facilitar la administración de la sustancia problema: los efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de dicha sustancia; los efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia problema que puedan modificar sus características de toxicidad; y los efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

Selección de las dosis

20. Normalmente, el estudio debe incluir al menos tres dosis y un control en paralelo. A la hora de seleccionar los niveles adecuados de dosis, el investigador ha de considerar toda la información disponible, incluida la información sobre dosis procedente de estudios anteriores, los datos toxicocinéticos de animales gestantes o no gestantes, la medida de la transferencia por la leche y las estimaciones de la exposición humana. Si se dispone de datos toxicocinéticos que indiquen saturación de los procesos toxicocinéticos en función de la dosis, debe tenerse cuidado para evitar niveles altos de dosis que provoquen claramente la saturación, siempre, por supuesto, que la exposición humana prevista esté bastante por debajo del punto de saturación. En tales casos, la dosis más alta debe estar en el punto de inflexión de la transición a un comportamiento toxicocinético no lineal, o justo ligeramente por encima de dicho punto.
21. En ausencia de datos toxicocinéticos pertinentes, las dosis deben basarse en los efectos tóxicos, a menos que las características fisicoquímicas de la sustancia problema impongan alguna limitación. Si las dosis se basan en la toxicidad, la dosis más alta debe seleccionarse con el propósito de inducir ciertos efectos de toxicidad sistémica, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso de los animales.
22. Debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis con el fin de demostrar la existencia de una eventual relación del efecto con la dosis y de establecer los niveles sin efecto adverso observado (NOAEL), o las dosis cerca del límite de detección que permitan la determinación de una dosis de referencia para el parámetro o parámetros más sensibles. Para evitar grandes separaciones entre los NOAEL y los LOAEL, suele ser adecuado un intervalo del doble o cuádruple. A menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo antes que utilizar un intervalo muy grande entre dosis (por ejemplo, con un factor superior a 10).

23. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Este grupo de control no debe recibir tratamiento, o recibir un placebo, o ser un grupo de control del vehículo si este se utiliza para administrar la sustancia. En este caso, el grupo de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado.

Ensayo límite

24. Es posible que no sea necesario llevar a cabo un estudio con varias dosis diferentes si no hay indicios de toxicidad a una dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal al día en estudios con administración continuada, o si no se prevé que haya toxicidad según los datos sobre sustancias relacionadas estructural o metabólicamente, que indiquen similitud en las propiedades metabólicas *in vivo/in vitro*. En tales casos, el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación puede efectuarse con un grupo de control y una sola dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal al día. Sin embargo, en caso de que con esta dosis límite se encuentren indicios de toxicidad para la reproducción o para el desarrollo, será necesario llevar a cabo más estudios a dosis menores para determinar un NOAEL. Estas consideraciones sobre el ensayo límite son aplicables solo cuando la exposición humana no indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

PROCEDIMIENTOS

Exposición de la descendencia

25. La exposición alimentaria es el método preferido de administración. Si se realizan ensayos por vía oral forzada, debe tenerse en cuenta que normalmente las crías reciben la sustancia problema solo indirectamente a través de la leche materna, hasta que se inicie la administración directa tras el destete. En los estudios en que la sustancia problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, las crías también la reciben directamente cuando empiezan a alimentarse solas en la última semana de lactancia. Debe estudiarse la conveniencia de modificar el diseño del estudio cuando la excreción de la sustancia problema en la leche sea escasa y cuando no haya pruebas de una exposición continua de los descendientes. En estos casos, debe considerarse la administración directa de la sustancia a las crías durante la lactancia, según la información disponible sobre toxicocinética, toxicidad para la progenie o cambios en los biomarcadores (3)(4). Antes de realizar estudios de administración directa de la sustancia a las crías lactantes, deben considerarse cuidadosamente sus ventajas e inconvenientes (5).

Calendario y administración de las dosis

26. A partir de estudios anteriores de toxicidad con administración continuada de una duración adecuada puede conseguirse cierta información sobre los ciclos estrales, la histopatología de los aparatos reproductores masculinos y femeninos, y el análisis del esperma testicular o epididimario. Por lo tanto, la duración del tratamiento antes del apareamiento en el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación tiene como objetivo la detección de efectos sobre los cambios funcionales que pueden interferir con la conducta de apareamiento y la fertilización. El tratamiento antes del apareamiento debe ser lo bastante largo para lograr unas condiciones estables de exposición en los machos y hembras P. En la mayoría de los casos se considera adecuado un período de 2 semanas de tratamiento antes del apareamiento para ambos sexos. En el caso de las hembras, esto incluye 3-4 ciclos estrales completos y debe ser suficiente para detectar cualquier efecto adverso sobre dichos ciclos. En los machos, esto equivale al tiempo necesario para el tránsito epididimario de los espermatozoides en maduración y debe permitir la detección de los efectos post-testiculares en el esperma (durante las fases finales de la espermiogénesis y la maduración espermática en el epidídimo) sobre el apareamiento. En el momento del sacrificio, cuando están programados el estudio de la histopatología testicular y epididimaria y el análisis de los parámetros del esperma, los machos P y F₁ se habrán expuesto durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (6)(7)(8)(9); véase también el documento de orientación de la OCDE 151 (40).
27. Las situaciones de exposición de los machos antes del apareamiento pueden modificarse si en estudios anteriores se han identificado claramente toxicidad testicular (alteración de la espermatogénesis) o efectos sobre la integridad y la función del esperma. Del mismo modo, en el caso de las hembras, pueden justificarse diferentes situaciones de exposición antes del apareamiento si se conoce algún efecto de la sustancia problema sobre el ciclo estral y, por tanto, sobre la receptividad sexual. En casos especiales puede ser aceptable que el tratamiento de las hembras P no comience hasta haberse obtenido un frotis con presencia de esperma [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)].
28. Una vez establecido el período de tratamiento antes del apareamiento, se administra a los animales la sustancia problema a un ritmo de 7 días por semana, de forma continua hasta la autopsia. Todos los animales deben recibir la sustancia de la misma manera. La administración de la sustancia debe continuar durante el período de apareamiento de 2 semanas y, en el caso de las hembras P, a lo largo de la gestación y lactancia hasta el día del sacrificio, después del destete. Los machos deben tratarse de la misma manera, hasta su sacrificio en el momento en que se desteten los animales de la generación F₁. Para la autopsia, debe darse prioridad a las hembras cuya autopsia ha de realizarse en el mismo día de lactancia, o en uno similar. La autopsia de los machos puede repartirse a lo largo de

un número mayor de días, en función de las instalaciones del laboratorio. A menos que ya se haya iniciado durante la lactancia, la administración directa a los machos y hembras seleccionados de la generación F₁ debe comenzar en el destete y proseguir hasta la autopsia prevista, dependiendo de la cohorte asignada.

29. En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe especificarse la opción elegida.
30. Cuando la sustancia problema se administre por vía oral forzada, el volumen de líquido administrado no debe en principio exceder de 1 ml/100 g peso corporal (o de 0,4 ml/100 g peso corporal en caso de aceite como, por ejemplo, aceite de maíz). Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. El tratamiento debe administrarse todos los días a una hora similar. La dosis que se administra a cada animal debe calcularse normalmente con arreglo a la última determinación de su peso corporal y ajustarse al menos una vez por semana en los machos adultos y en las hembras adultas no gestantes, y cada dos días en las hembras gestantes y en los animales de la generación F₁ cuando se administre antes del destete y durante las dos semanas siguientes a este. Si los datos indican una baja transferencia placentaria de la sustancia problema, puede ser necesario ajustar la dosis administrada por vía oral forzada en la última semana de gestación para evitar que sea excesivamente tóxica para la madre. El día del parto, las hembras no deben recibir la sustancia por vía oral forzada, ni por cualquier otra vía de tratamiento que exija la manipulación del animal; es preferible no administrar la sustancia problema ese día antes que perturbar el proceso del parto.

Apareamiento

31. Cada hembra P debe ponerse con un solo macho sin parentesco con ella, seleccionado al azar, del mismo grupo de tratamiento (emparejamiento 1: 1) hasta que se observen signos de cópula o hayan pasado 2 semanas. Si es insuficiente el número de machos, por ejemplo debido a mortalidad masculina antes del apareamiento, es posible emparejar con una segunda hembra (1:1) a machos que se hayan apareado antes con otra, de forma que se emparejen todas las hembras. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Los animales deben separarse tan pronto como sea posible, una vez observados los signos del apareamiento. Si no ha habido apareamiento al cabo de 2 semanas, los animales deben separarse sin darles más oportunidades para aparearse. Las parejas deben quedar claramente identificadas en los resultados.

Tamaño de la camada

32. El día 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección aleatoria de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cinco machos y cinco hembras por camada. No es apropiada la eliminación selectiva de las crías, por ejemplo en función del peso corporal. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras).

Selección de las crías para los estudios tras el destete (véase la figura 1)

33. En el momento del destete (alrededor del DPN 21) se seleccionan para su examen posterior crías de todas las camadas disponibles, hasta 20 por grupo de tratamiento y de control, y se conservan hasta su madurez sexual (salvo que se tengan que someter a ensayo antes). Las crías se seleccionan aleatoriamente, con la salvedad de que no se incluirán los animales con retraso evidente (animales con un peso corporal que se encuentre más de dos desviaciones típicas por debajo del peso medio de las crías de la camada respectiva), dado que es poco probable que sean representativos del grupo de tratamiento.

El DPN 21, las crías F₁ seleccionadas se asignan aleatoriamente a una de las tres cohortes siguientes:

Cohorte 1 (1A y 1B) = ensayo de toxicidad para la reproducción o el desarrollo

Cohorte 2 (2A y 2B) = ensayo de neurotoxicidad para el desarrollo

Cohorte 3 = ensayo de inmunotoxicidad para el desarrollo

Cohorte 1A: Un macho y una hembra por camada y grupo (20/sexo/grupo): selección prioritaria para la evaluación primaria de efectos sobre los aparatos reproductores y de la toxicidad general.

Cohorte 1B: Un macho y una hembra por camada y grupo (20/sexo/grupo): selección prioritaria para la posterior evaluación del comportamiento reproductor apareando animales F_1 , en su caso [véase el documento de orientación de la OCDE 117 (39)], y para obtener datos adicionales de histopatología en caso de que se sospeche que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino, o cuando los resultados de la cohorte 1A sean dudosos.

Cohorte 2A: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un macho o una hembra por camada) asignadas para el ensayo neuroconductual seguido de la evaluación de la neurohistopatología como adultos.

Cohorte 2B: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un macho o una hembra por camada) asignadas para la evaluación de la neurohistopatología en el momento del destete (DPN 21 o 22). Si es insuficiente el número de animales, debe darse preferencia a la asignación de animales a la cohorte 2A.

Cohorte 3: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un animal por camada, en la medida de lo posible). Puede ser necesario disponer de más crías del grupo de control para que actúen como animales de control positivo en el ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T (TDAR) en el DPN 56 ± 3 .

34. En caso de que sea insuficiente el número de crías de una camada para cubrir todas las cohortes, tendrá prioridad la cohorte 1, ya que puede ampliarse para producir una generación F_2 . Pueden asignarse crías adicionales a cualquiera de las cohortes en caso de preocupación específica, por ejemplo si se sospecha que una sustancia es neurotóxica, inmunotóxica o tóxica para la reproducción. Estas crías podrán utilizarse para exámenes en diferentes momentos o para la evaluación de parámetros adicionales. En las crías no asignadas a ninguna cohorte se estudiará la bioquímica clínica (punto 55) y se someterán a autopsia macroscópica (punto 68).

Segundo apareamiento de los animales P

35. No se recomienda normalmente un segundo apareamiento para los animales P, ya que implica la pérdida de información importante sobre el número de puntos de implantación (y, por tanto, de datos de muerte postimplantación y perinatal, indicadores de un eventual potencial teratogénico) de la primera camada. La necesidad de comprobar o aclarar un efecto en las hembras expuestas se puede satisfacer mejor ampliando el estudio para incluir un apareamiento de la generación F_1 . Sin embargo, un segundo apareamiento de los machos P con hembras sin tratar es siempre una opción para aclarar resultados dudosos o para caracterizar mejor los efectos sobre la fertilidad observados en el primer apareamiento.

OBSERVACIONES EN VIVO

Observaciones clínicas

36. Con los animales P y con los F_1 seleccionados, se hace una observación clínica general una vez al día. En caso de administración por vía oral forzada, el momento de las observaciones clínicas debe ser antes y después de la administración de la sustancia (para detectar posibles signos de toxicidad asociados con la concentración plasmática máxima). Se registran los cambios pertinentes en el comportamiento, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad. Dos veces al día, y una vez al día durante los fines de semana, todos los animales se observan para detectar los casos de toxicidad grave, morbilidad y mortalidad.
37. Además, semanalmente se efectúa un examen más detallado de todos los animales P y F_1 (tras el destete); puede hacerse coincidiendo con una ocasión en que se pesen los animales, lo que reduciría al mínimo el estrés de la manipulación. Las observaciones deben llevarse a cabo cuidadosamente y registrarse utilizando sistemas de puntuación que hayan sido definidos por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás).

Peso corporal y consumo de alimento y agua

38. Los animales P se pesan el día de la primera administración y a continuación al menos una vez por semana. Además, las hembras P se pesan durante la lactancia, los mismos días en que se pesen las crías de sus camadas (véase el punto 44). Todos los animales F₁ se pesan individualmente el día del destete (DPN 21) y a continuación al menos una vez por semana. El peso corporal se registra también el día en que el animal alcanza la pubertad (finalización de la separación del prepucio o permeabilidad vaginal). Todos los animales se pesan en el momento del sacrificio.
39. Durante el estudio, se registra el consumo de alimentos y agua (en el caso de la administración de la sustancia problema con el agua de bebida) al menos una vez por semana, los mismos días en que se determinan los pesos corporales de los animales (excepto durante la cohabitación). El consumo de alimentos de cada jaula de animales F₁ se registra semanalmente, empezando en el momento de la asignación a la cohorte respectiva.

Ciclos estrales

40. Puede disponerse de información preliminar sobre efectos en el ciclo estral relacionados con la sustancia, procedente de estudios de toxicidad con administración continuada, y esa información puede utilizarse en el diseño de un protocolo del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación que sea específico de la sustancia problema. Normalmente la evaluación de los ciclos estrales (por citología vaginal) empezará al principio del período de tratamiento y proseguirá hasta la confirmación del apareamiento o el final del período de apareamiento de 2 semanas. Si las hembras se han sometido a ensayo de cribado para comprobar que tienen ciclos estrales normales antes del tratamiento, es útil continuar haciendo frotis desde el inicio del tratamiento, pero si hay alguna preocupación en cuanto a posibles efectos inespecíficos al comienzo del tratamiento (como una reducción inicial significativa del consumo de alimentos), es posible dejar a los animales que se adapten al tratamiento durante un máximo de dos semanas antes de empezar el período de recogida de frotis de dos semanas que precede al emparejamiento. Si el período de tratamiento de las hembras se amplía de esta manera (es decir, hasta cuatro semanas de tratamiento previo al apareamiento) se debería considerar la adquisición de animales más jóvenes y la ampliación del período de tratamiento de los machos antes del emparejamiento. La toma de células vaginales o cervicales ha de hacerse con cuidado para no dañar la mucosa y evitar una pseudogestación (10)(11).
41. Deben examinarse diariamente los frotis vaginales de todas las hembras F₁ de la cohorte 1A, tras el inicio de la permeabilidad vaginal, hasta que se registre el primer frotis cornificado, para determinar el intervalo de tiempo entre estos dos acontecimientos. También deben supervisarse los ciclos estrales de todas las hembras F₁ de la cohorte 1A durante dos semanas, a partir del DPN 75, aproximadamente. Por otra parte, si fuera necesario aparear la generación F₁, se supervisará la citología vaginal de la cohorte 1B desde el momento del emparejamiento hasta que se observen signos de apareamiento.

Apareamiento y gestación

42. Además de los parámetros normales (por ejemplo, peso corporal, consumo de alimentos, observaciones clínicas, incluidos los controles de mortalidad/morbilidad), se registrarán las fechas de emparejamiento, de inseminación y de parto, y se calcularán el intervalo precoital (entre el emparejamiento y la inseminación) y la duración de la gestación (de la inseminación al parto). Las hembras P deben examinarse atentamente en el momento previsto del parto para detectar posibles signos de distocia. Deberán registrarse las eventuales anomalías observadas en la conducta de nidificación o de lactación.
43. El día en que se produce el parto es el día 0 de la lactancia (DL 0) para la madre y el día postnatal (DPN 0) para la descendencia. Alternativamente, todas las comparaciones pueden basarse también en el tiempo postcoital para eliminar la confusión en los datos de desarrollo postnatal debida a diferencias en la duración de la gestación; sin embargo, también deberá registrarse el calendario en relación con el parto. Esto es especialmente importante si la sustancia problema ejerce alguna influencia sobre la duración de la gestación.

Parámetros de los descendientes

44. Se examinan todas las camadas lo antes posible después del parto (DPN 0 o 1) para determinar el número y sexo de las crías, la mortinatalidad, el número de nacidos vivos y la presencia de anomalías macroscópicas (anomalías visibles externamente, incluido el paladar hendido; las hemorragias subcutáneas; las anomalías en el color o la textura de la piel; la presencia de cordón umbilical; la falta de leche en el estómago; la presencia de secreciones secas). Además, el primer examen clínico de los recién nacidos debe incluir una evaluación cualitativa de la temperatura corporal, del estado de actividad y de la reacción a la manipulación. Las crías halladas muertas el DPN 0 o posteriormente deben examinarse para detectar posibles anomalías y determinar la causa de la muerte. Las crías vivas se cuentan y se pesan individualmente el DPN 0 o el DPN 1, y periódicamente a continuación como, por ejemplo, al menos los DPN 4, 7, 14 y 21. Los exámenes clínicos, según proceda en función de la edad de los

animales, deben repetirse cuando se pesen los descendientes, o más a menudo si en el momento del nacimiento ha habido observaciones específicas. Los signos anotados pueden incluir, sin ánimo de exhaustividad, las anomalías externas, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias o comportamientos anómalos.

45. Debe medirse la distancia anogenital (DAG) de cada cría, al menos en una ocasión entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe recogerse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (12). Debe comprobarse la presencia de pezones/areolas en las crías macho el DPN 12 o 13.
46. Todos los animales F_1 seleccionados se evalúan diariamente en cuanto a la separación balano-prepucial o la permeabilidad vaginal, según sean machos o hembras, respectivamente, comenzando antes de la fecha prevista para la aparición de dichos signos, a fin de detectar si se produce una maduración sexual precoz. Deben anotarse las eventuales anomalías de los órganos genitales, tales como la hebra vaginal persistente, la hipospadia o el pene hendido. La madurez sexual de los animales F_1 se compara con el desarrollo físico mediante la determinación de la edad y del peso corporal en el momento de la separación balano-prepucial o de la apertura de la vagina, según se trate de machos o hembras, respectivamente.

Evaluación de la posible neurotoxicidad para el desarrollo (cohortes 2A y 2B)

47. Deben utilizarse para la evaluación de la neurotoxicidad los diez machos y diez hembras de la cohorte 2A y los diez machos y diez hembras de la cohorte 2B, de cada grupo de tratamiento (para cada cohorte: 1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria). Los animales de la cohorte 2A deben someterse al ensayo de sobresalto acústico, a la batería de observaciones funcionales, y a la evaluación de la actividad motriz (véanse los puntos 48-50) y de la neuropatología (véanse los puntos 74-75). Debe procurarse que las variaciones en todas las condiciones de ensayo sean mínimas y no estén relacionadas sistemáticamente con el tratamiento. Entre las variables que pueden afectar al comportamiento se encuentran el nivel sonoro (por ejemplo, ruido intermitente), la temperatura, la humedad, la iluminación, los olores, la hora del día y las distracciones del entorno. Los resultados de los ensayos de neurotoxicidad deben interpretarse en relación con las bandas de referencia adecuadas de los controles históricos. Los animales de la cohorte 2B deben utilizarse para la evaluación de la neuropatología el DPN 21 o 22 (véanse los puntos 74-75).
48. El DPN 24 (\pm 1 día) debe llevarse a cabo un ensayo de sobresalto acústico con los animales de la cohorte 2A. El día del ensayo deben compensarse los grupos de tratamiento y de control. Cada sesión consiste en 50 pruebas. Al realizar el ensayo de sobresalto acústico, debe determinarse la amplitud de la respuesta media de cada bloque de 10 pruebas (5 bloques de 10 pruebas), con las condiciones de ensayo optimizadas para lograr la habituación dentro de la sesión. Estos procedimientos deben ser compatibles con el método de ensayo B.53 (35).
49. En un momento adecuado entre el DPN 63 y el DPN 75, los animales de la cohorte 2A se someten a una batería de observaciones funcionales y a un ensayo automatizado de la actividad motriz. Estos procedimientos deben ser compatibles con los métodos de ensayo B.43 (33) y B.53 (35). La batería de observaciones funcionales incluye una descripción detallada del aspecto, del comportamiento y de la integridad funcional del animal. La evaluación se efectúa mediante observaciones en la jaula de alojamiento, después de trasladar al animal a un ámbito normalizado de observación (campo abierto) donde pueda moverse libremente, y mediante pruebas de manipulación. Los ensayos deben graduarse desde el menos hasta el más interactivo. En el apéndice 1 se presenta una lista de medidas. Todos los animales deben ser observados cuidadosamente por observadores cualificados que no conozcan la situación de los animales respecto al tratamiento, utilizando procedimientos normalizados para reducir al mínimo la variabilidad del observador. En la medida de lo posible, es conveniente que el mismo observador evalúe a los animales en un ensayo determinado. Si esto no es posible, hay que demostrar la fiabilidad inter-observadores. Para cada parámetro de la batería de ensayos de comportamiento deben emplearse escalas y criterios de puntuación explícitos, definidos desde el punto de vista operativo. Si es posible, deben elaborarse medidas cuantitativas objetivas para los parámetros de observación, que implican una clasificación subjetiva. Para la actividad motriz, cada uno de los animales se somete a ensayo individualmente. La sesión de ensayo debe ser lo suficientemente larga para demostrar la habituación de los controles dentro de la sesión. La actividad motriz debe supervisarse con un aparato automático de registro de la actividad, que debe ser capaz de detectar tanto los aumentos como los descensos de la misma (es decir, la actividad de referencia medida por el dispositivo no debe ser tan baja que no se puedan detectar los eventuales descensos, ni tan elevada que no se puedan detectar los eventuales aumentos de la actividad). Cada dispositivo debe comprobarse mediante procedimientos estándar para garantizar, en la medida de lo posible, la fiabilidad del funcionamiento con diferentes dispositivos y en diferentes días. En la medida de lo posible, los grupos tratados deben repartirse de forma equilibrada entre los distintos dispositivos. Los grupos tratados deben equilibrarse en cuanto a los momentos del ensayo a fin de evitar confusiones debidas a los ritmos circadianos de actividad.
50. Si existe información que indique la necesidad de hacer otras pruebas funcionales (por ejemplo, sensitivas, sociales, cognitivas), estas deben integrarse sin comprometer la integridad de las otras evaluaciones efectuadas en el estudio. Si estas pruebas se realizan con los mismos animales utilizados para hacer el ensayo de sobresalto acústico, la batería de observaciones funcionales y el ensayo de actividad motriz, deben programarse los ensayos

diferentes de forma que se reduzca al mínimo el riesgo de comprometer la integridad de dichos ensayos. Puede ser especialmente útil realizar procedimientos complementarios cuando la observación empírica, los efectos previstos o el mecanismo o modo de acción indiquen un tipo determinado de neurotoxicidad.

Evaluación de la posible inmunotoxicidad para el desarrollo (cohorte 3)

51. El día DPN 56 (\pm 3 días), los 10 machos y 10 hembras de la cohorte 3 procedentes de cada grupo de tratamiento (1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria) deben utilizarse en un ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T, es decir, la respuesta primaria de anticuerpos IgM a un antígeno dependiente de linfocitos T, como los eritrocitos de oveja (SRBC) o la hemocianina de la lapa californiana (KLH), de acuerdo con los actuales procedimientos de ensayo de la inmunotoxicidad (14)(15). La respuesta puede evaluarse mediante el recuento de células que forman calvas específicas (PFC) en el bazo o por la determinación del título de anticuerpos de tipo IgM específicos de KLH o de SRBC en el suero mediante ELISA, en el máximo de la respuesta. Las respuestas, por lo general, presentan un máximo a los cuatro (PFC) o cinco (ELISA) días después de la inmunización por vía intravenosa. Si la respuesta primaria de anticuerpos se comprueba mediante el recuento de células que forman calvas, es posible evaluar subgrupos de animales en días distintos, siempre que: la inmunización y el sacrificio del subgrupo se programen de manera que las PFC se cuenten en el máximo de la respuesta; que los subgrupos contengan un número igual de descendientes machos y hembras de todos los grupos de dosis, incluidos los controles; y que los subgrupos se evalúen a aproximadamente la misma edad postnatal. La exposición a la sustancia problema continuará hasta el día antes de recoger los bazos para ver la respuesta de PFC o el suero para la prueba ELISA.

Evaluación complementaria de la posible toxicidad para la reproducción (cohorte 1B)

52. Los animales de la cohorte 1B pueden mantenerse en tratamiento después del DPN 90 y criarse para obtener una generación F₂ en caso necesario. Deben cohabitar machos y hembras del mismo grupo de dosis (evitando el emparejamiento de hermanos) durante un período de hasta dos semanas, empezando como pronto el DPN 90, pero sin exceder del DPN 120. Los procedimientos deben ser similares a los de los animales P. Sin embargo, basándose en la ponderación de las pruebas, puede bastar si se sacrifican las camadas el DPN 4 en lugar de mantenerlas hasta el destete o incluso después.

OBSERVACIONES FINALES

Bioquímica clínica y hematología

53. Deben supervisarse los efectos sistémicos en los animales P. En el sacrificio se toman muestras de sangre en ayunas, de un lugar definido, de diez machos y hembras P seleccionados al azar, por grupo de dosis; estas muestras se conservan en condiciones adecuadas y se someten a un examen parcial o completo de hematología, bioquímica clínica, ensayo de T4 y TSH, o a otros exámenes sugeridos por el perfil conocido de efectos de la sustancia problema [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. Deben examinarse los siguientes parámetros hematológicos: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento total y diferencial de leucocitos, recuento de plaquetas y potencial/tiempo de coagulación. Entre las investigaciones en plasma o suero deben figurar las siguientes: glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina y al menos dos enzimas indicadoras de efectos hepatocelulares (tales como la alanina-aminotransferasa, la aspartato-aminotransferasa, la fosfatasa alcalina, la gamma-glutamil-transpeptidasa y la sorbitol-deshidrogenasa). La determinación de otras enzimas y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias. Además, es posible extraer sangre de todos los animales y almacenarla para realizar eventuales análisis en un momento posterior con el fin de clarificar efectos dudosos o para generar datos de exposición interna. Si no se contempla un segundo apareamiento entre los animales P, las muestras de sangre se obtienen justo antes del procedimiento del sacrificio previsto, o como parte del mismo. En el caso de que se mantengan en vida los animales, las muestras de sangre deben recogerse unos días antes de que se apareen por segunda vez. Salvo que haya datos de estudios con administración continuada que indiquen que el parámetro no se ve afectado por la sustancia problema, debe efectuarse un análisis de orina antes del sacrificio y hay que evaluar los parámetros siguientes: aspecto, volumen, osmolaridad o densidad, pH, contenido en proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas, y restos celulares. También puede recogerse la orina para supervisar la excreción de la sustancia problema o de sus metabolitos.
54. También deben supervisarse los efectos sistémicos en los animales F₁. En el sacrificio se toman muestras de sangre en ayunas, de un lugar definido, de diez machos y hembras de la cohorte 1A seleccionados al azar, por grupo de dosis; estas muestras se conservan en condiciones adecuadas y se someten a un examen de bioquímica clínica normal, incluida la evaluación de los niveles en suero de las hormonas tiroideas (T4 y TSH), y de hematología (recuento total y diferencial de leucocitos y recuento de eritrocitos), así como a un análisis de orina.

55. El excedente de crías se somete a autopsia macroscópica el DPN 4 y se sopesa la medición de las concentraciones de la hormona tiroidea (T4) en el suero. En caso necesario, puede agruparse la sangre de los neonatos (DPN 4) por camadas para los análisis bioquímicos o de la hormona tiroidea. También se recoge sangre para los análisis de T4 y TSH de los animales destetados que se someten a autopsia macroscópica el DPN 22 (crías F₁ no seleccionadas para las cohortes).

Parámetros del esperma

56. Los parámetros del esperma deben medirse en todos los machos de la generación P, salvo que se disponga de datos que indiquen que tales parámetros no se ven afectados en un estudio de 90 días. El examen de los parámetros del esperma debe realizarse con todos los machos de la cohorte 1A.
57. En el momento del sacrificio se registran los pesos de los testículos y epidídimos de todos los machos P y F₁ (cohorte 1A). Al menos un testículo y un epidídimo se reservan para el examen histopatológico. Los epidídimos restantes se utilizan para el recuento de las reservas de esperma de la cola del epidídimo (16)(17). Además, se recoge el esperma de la cola del epidídimo (o del conducto deferente) utilizando métodos que reduzcan al mínimo las alteraciones para la evaluación de la motilidad y morfología de los espermatozoides (18).
58. La movilidad del esperma puede evaluarse inmediatamente después del sacrificio o grabarse para su posterior análisis. El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles puede determinarse de forma subjetiva u objetiva mediante el análisis del movimiento con ayuda de ordenador (19)(20)(21)(22)(23)(24). Para la evaluación de la morfología de los espermatozoides, debe examinarse una muestra de esperma epididimario (o del conducto deferente) como preparación fijada o en fresco (25) y hay que clasificar al menos 200 espermatozoides por muestra como normales (tienen normales tanto la cabeza y el segmento medio como la cola) o anormales. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides incluyen las fusiones, las cabezas aisladas y las cabezas o las colas deformes (26). La presencia de cabezas deformes o grandes puede indicar alteraciones de la espermiogénesis.
59. Si se congelan muestras de esperma, se fijan los frotis y se graban imágenes para el análisis de la movilidad del esperma en el momento de la autopsia (27), es posible limitar los análisis posteriores a los machos de control y a los que han recibido la dosis alta. No obstante, si se observan efectos relacionados con el tratamiento, también deben evaluarse los grupos que han recibido las dosis inferiores.

Autopsia macroscópica

60. En el momento del sacrificio o de la muerte prematura, todos los animales P y F₁ se someten a autopsia y a examen macroscópico para detectar los eventuales cambios patológicos o anomalías estructurales. Se prestará especial atención a los órganos genitales. Deben registrarse las crías moribundas que se sacrifiquen por métodos compasivos y las crías muertas, y, si no están descompuestas, deben examinarse para detectar posibles anomalías y establecer la causa de la muerte, y conservarse posteriormente.
61. En el caso de las hembras adultas P y F₁, se examina el día de la autopsia un frotis vaginal para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con la histopatología de los órganos genitales. Los úteros de todas las hembras P (y de las hembras F₁, si procede) se examinan para detectar la posible presencia de puntos de implantación y contar su número, de una manera que no comprometa la evaluación histopatológica.

Pesaje de los órganos y conservación de los tejidos — animales adultos P y F₁

62. En el momento del sacrificio, se determinan el peso corporal y el peso húmedo de los órganos enumerados a continuación (lo antes posible tras la disección a fin de evitar su desecación) de todos los animales P y de todos los adultos F₁, de las cohortes pertinentes, como se indica a continuación. Estos órganos deben conservarse posteriormente en condiciones adecuadas. A menos que se especifique lo contrario, los órganos pares pueden pesarse por separado o combinados, de forma coherente con la práctica habitual del laboratorio correspondiente.

— Útero (con oviductos y cuello), ovarios

— Testículos, epidídimos (totales y colas de las muestras utilizadas en los recuentos de esperma)

— Próstata (partes dorsolateral y ventral combinadas). Hay que extremar el cuidado cuando se cortan los tejidos adherentes del complejo de la próstata para evitar la perforación de las vesículas seminales llenas de líquido. En caso de efectos sobre el peso total de la próstata relacionados con el tratamiento, deben separarse cuidadosamente los segmentos dorsolateral y ventral, previa fijación, y pesarse aparte.

- Vesículas seminales con las glándulas coagulantes y sus líquidos (como una sola unidad)
 - Encéfalo, hígado, riñones, corazón, bazo, timo, hipófisis, glándula tiroidea (tras su fijación), cápsulas suprarrenales y órganos o tejidos diana conocidos.
63. Además de los órganos enumerados anteriormente, deben conservarse, en condiciones adecuadas, muestras de los nervios periféricos, músculos, médula espinal, ojos más nervio óptico, tubo digestivo, vejiga urinaria, pulmón, tráquea (con las glándulas tiroidea y paratiroides), médula ósea, conducto deferente (machos), glándula mamaria (machos y hembras) y vagina.
64. Todos los órganos de los animales de la cohorte 1A se pesarán y se conservarán para su estudio histopatológico.
65. Para la investigación de los efectos inmunotóxicos inducidos antes y después del nacimiento, 10 machos y 10 hembras de la cohorte 1A de cada grupo de tratamiento (1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria) serán objeto de lo siguiente:
- pesaje de los ganglios linfáticos asociados con la vía de exposición y distantes de ella (además del pesaje de las cápsulas suprarrenales, el timo y el bazo, ya realizado en todos los animales de la cohorte 1A),
 - análisis de las subpoblaciones de linfocitos esplénicos (linfocitos T CD 4+ y CD 8+, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales), utilizando la mitad del bazo, ya que la otra mitad se reserva para la evaluación histopatológica.

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos esplénicos en animales no inmunizados (cohorte 1A) determinará si la exposición está relacionada con un cambio de la distribución en el equilibrio inmunológico de los linfocitos derivados del timo “cooperadores” (CD 4+) o citotóxicos (CD 8+) o de los linfocitos citolíticos naturales (respuestas rápidas a las células neoplásicas y a los patógenos).

66. De los animales de la cohorte 1B deben pesarse los órganos siguientes, y los tejidos correspondientes se preparan en tacos de biopsia:
- Vagina (no pesada)
 - Útero con cuello
 - Ovarios
 - Testículos (por lo menos uno)
 - Epidídimos
 - Vesículas seminales y glándulas coagulantes
 - Próstata
 - Hipófisis
 - Órganos diana identificados.

El estudio de histopatología de la cohorte 1B se llevará a cabo si los resultados de la cohorte 1A son dudosos o si se sospecha que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino.

67. Cohortes 2A y 2B: Ensayo de neurotoxicidad para el desarrollo (DPN 21 o DPN 22 y descendientes adultos). Los animales de la cohorte 2A se sacrifican tras los ensayos de comportamiento, se registra el peso de su encéfalo y se hace un estudio completo de neurohistopatología con fines de evaluación de la neurotoxicidad. Los animales de la cohorte 2B se sacrifican el DPN 21 o el DPN 22, se registra el peso de su encéfalo y se hace un examen microscópico del encéfalo con fines de evaluación de la neurotoxicidad. La fijación por perfusión es obligatoria para los animales de la cohorte 2A y opcional para los de la cohorte 2B, como se contempla en el método de ensayo B.53 (35).

Pesaje de los órganos y conservación de los tejidos — animales destetados F₁

68. Las crías que no se hayan seleccionado para las cohortes, incluidos los animales con retraso, se sacrifican tras el destete, el DPN 22, salvo que los resultados indiquen la necesidad de continuar las investigaciones in vivo. Las crías sacrificadas se someten a autopsia macroscópica, incluida una evaluación de los órganos genitales, como se describe en los puntos 62 y 63. Se pesarán y conservarán en condiciones adecuadas el encéfalo, el bazo y el timo de hasta 10 crías por sexo y por grupo, del máximo de camadas posible. Además, podrán conservarse para su análisis microscópico posterior los tejidos mamarios de estas crías machos y hembras ⁽¹⁾ [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. Deben conservarse las anomalías macroscópicas y los tejidos diana para un posible examen histológico.

⁽¹⁾ La investigación realizada ha puesto de manifiesto que la glándula mamaria, especialmente su desarrollo durante las primeras fases de la vida, constituye un parámetro sensible de la acción de los estrógenos. Se recomienda incluir en el presente método de ensayo, tras la validación, parámetros relativos a las glándulas mamarias de ambos sexos.

Examen de histopatología — animales P

69. Se lleva a cabo un examen completo de histopatología de los órganos enumerados en los puntos 62 y 63 procedentes de todos los animales P de los grupos de dosis alta y de control. También deben examinarse los órganos que muestren cambios relacionados con el tratamiento, procedentes de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores, para ayudar a determinar el NOAEL. Además de ello, se someterán a evaluación histopatológica los órganos genitales de todos los animales en los que se sospeche una disminución de la fertilidad como, por ejemplo, los que no se hayan apareado, no hayan concebido, no hayan engendrado o no hayan tenido una progenie sana, o en los que se hayan observado alteraciones del ciclo estral o de la cantidad, movilidad o morfología de los espermatozoides, así como todas las lesiones macroscópicas.

Examen de histopatología — animales F₁*Animales de la cohorte 1*

70. Se lleva a cabo un examen completo de histopatología de los órganos enumerados en los puntos 62 y 63 procedentes de todos los animales adultos de la cohorte 1A de los grupos de dosis alta y de control. Todas las camadas deben estar representadas por un mínimo de 1 cría por sexo. También deben examinarse los órganos y tejidos que muestren cambios relacionados con el tratamiento y todas las lesiones macroscópicas de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores para ayudar a determinar el NOAEL. Para la evaluación de los efectos inducidos antes y después del nacimiento sobre los órganos linfáticos, debe procederse también al examen de la histopatología de los ganglios linfáticos y de la médula ósea recogidos de 10 machos y 10 hembras de la cohorte 1A, además de la evaluación histopatológica del timo, el bazo y las cápsulas suprarrenales, ya realizada con todos los animales de la cohorte 1A.
71. Si se sospecha que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino, se efectuará el examen de la histopatología de los tejidos genitales y endocrinos de todos los animales de la cohorte 1B, preparados en tacos de biopsia como se describe en el punto 66. Si los resultados de la cohorte 1A son dudosos, también deberá someterse a examen histopatológico la cohorte 1B.
72. Los ovarios de las hembras adultas deben contener folículos primordiales y en crecimiento, así como cuerpos lúteos; por lo tanto, el examen histopatológico debe estar orientado a la evaluación cuantitativa de los folículos primordiales y de los pequeños folículos en crecimiento, así como de los cuerpos lúteos, en las hembras F₁; el número de animales, la elección de la sección ovárica y el tamaño de la muestra de la sección han de ser adecuados desde el punto de vista estadístico para el procedimiento de evaluación empleado. El recuento folicular puede realizarse en primer lugar con los animales de control y con los que han recibido la dosis máxima y, en caso de que se observe un efecto adverso en los últimos, realizarse entonces con los animales de las dosis más bajas. En el examen debe hacerse el recuento de los folículos primordiales, que pueden estar combinados con los pequeños folículos en crecimiento, para efectuar la comparación de los ovarios de las hembras de los grupos tratados y los del grupo de control [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. La evaluación de los cuerpos lúteos debe efectuarse en paralelo con el ensayo de los ciclos estrales, de forma que en la evaluación pueda tenerse en cuenta la fase del ciclo. Se examinan el oviducto, el útero y la vagina, en cuanto al desarrollo correcto de cada órgano.
73. Se realizan exámenes histopatológicos detallados de los testículos de los machos F₁ a fin de detectar efectos relacionados con el tratamiento sobre la diferenciación y el desarrollo de los testículos y sobre la espermatogénesis (38). Cuando sea posible, deben examinarse secciones de la red testicular. Se examinan la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo y el conducto deferente en cuanto al desarrollo correcto de cada órgano, así como en cuanto a los parámetros requeridos para los machos P.

Animales de la cohorte 2

74. Se hace una evaluación de la neurohistopatología de todos los animales de la cohorte 2A de los grupos de dosis alta y de control, por sexo, tras haberse realizado los ensayos neuroconductuales (después del DPN 75, pero sin sobrepasar el DPN 90). Se hace un examen de la histopatología del encéfalo de todos los animales de la cohorte 2B de los grupos de dosis alta y de control, por sexo, el DPN 21 o el DPN 22. También deben examinarse los órganos o tejidos que muestren cambios relacionados con el tratamiento, procedentes de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores para contribuir a determinar el NOAEL. Se examinan secciones múltiples del encéfalo de los animales de las cohortes 2A y 2B, para evaluar los bulbos olfativos, la corteza cerebral, el hipocampo, los núcleos basales, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo (techo, tegmento y pedúnculos cerebrales), el tronco encefálico y el cerebelo. Se examinan los ojos (retina y nervio óptico) y muestras de los nervios periféricos, músculos y médula espinal, solo de los animales de la cohorte 2A. Todos los procedimientos neurohistológicos deben ser compatibles con el método de ensayo B.53 (35).
75. Deben llevarse a cabo evaluaciones morfométricas (cuantitativas) de zonas representativas del encéfalo (secciones homólogas cuidadosamente seleccionadas en función de puntos de referencia microscópicos fiables) y pueden

incluir mediciones lineales o de superficies de regiones específicas del encéfalo. Al nivel de cada punto de referencia deben hacerse al menos tres secciones consecutivas para seleccionar la sección más homóloga y representativa de la zona específica del encéfalo que deba evaluarse. El neuropatólogo debe aplicar su juicio para decidir si las secciones preparadas para la medición son homólogas de otras del conjunto de la muestra y, por tanto, adecuadas para incluirse, ya que las mediciones lineales en particular pueden cambiar dentro de una distancia relativamente corta (28). No deben utilizarse secciones que no sean homólogas. Aunque el objetivo sea tomar muestras de todos los animales reservados con tal fin (10/sexo/dosis), puede ser válido también un número inferior. Sin embargo, a efectos del presente método de ensayo no se considerará en general suficiente que las muestras procedan de menos de 6 animales/sexo/dosis. Puede utilizarse la estereología para identificar efectos relacionados con el tratamiento sobre parámetros tales como el volumen o el número de células de determinadas regiones neuroanatómicas. Todos los aspectos de la preparación de las muestras de tejido, desde la fijación de los tejidos hasta la disección de las muestras de tejido, el tratamiento de los tejidos y la tinción de las preparaciones microscópicas, deben seguir un diseño equilibrado de forma que cada lote contenga muestras representativas de cada grupo de dosis. Cuando vayan a aplicarse análisis morfométricos o estereológicos, el tejido del encéfalo debe incluirse en el medio apropiado al mismo tiempo para todos los niveles de dosis, a fin de evitar artefactos por retracción asociados con una conservación prolongada en el fijador.

INFORMES

Datos

76. Los datos se facilitan por separado y se resumen en forma de cuadro. Cuando proceda, de cada grupo de ensayo y cada generación, debe indicarse lo siguiente: el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales encontrados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, la fecha y la hora de las eventuales muertes o sacrificios compasivos, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de hembras que paren una camada, y el número de animales que muestran signos de toxicidad. Debe recogerse también una descripción de la toxicidad, con inclusión del momento de la aparición, la duración y la gravedad.
77. Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y aceptado. Los métodos estadísticos deben elegirse en la fase de diseño del estudio y deben tratar de forma adecuada los datos no normales (por ejemplo, los datos de los recuentos), los datos no considerados (p, ej., debido a un tiempo de observación limitado), la falta de independencia (por ejemplo, efectos de camada y repetición de medidas), y las varianzas desiguales. Los modelos mixtos lineales generalizados y los modelos de dosis-respuesta cubren una amplia categoría de instrumentos analíticos que pueden ser adecuados para los datos generados con arreglo al presente método de ensayo. El informe debe recoger información suficiente sobre el método de análisis y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda evaluar o reevaluar el análisis.

Evaluación de los resultados

78. Los resultados deben evaluarse en términos de efectos observados, incluyendo las observaciones microscópicas y las de la autopsia. La evaluación incluye la relación, o la ausencia de relación, entre la dosis y la presencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluidas las lesiones macroscópicas. También deben evaluarse los órganos diana, la fertilidad, las anomalías clínicas, el comportamiento reproductor y con la prole, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos y sobre el desarrollo. Debe prestarse especial atención a los cambios específicos de un sexo. A la hora de evaluar los resultados del ensayo deben tenerse en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema y, si están disponibles, los datos toxicocinéticos, incluidas la transferencia placentaria y la excreción en la leche.

Informe del ensayo

79. El informe del ensayo debe incluir la siguiente información obtenida en el presente estudio de los animales P, F₁ y F₂ (si procede):

Sustancia problema:

- Toda la información pertinente de que se disponga sobre las propiedades químicas, toxicocinéticas y toxicodinámicas de la sustancia problema;
- Datos de identificación;
- Pureza;

Vehículo (si procede):

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

Animales de experimentación:

- Especie y cepa utilizada;
- Número, edad y sexo de los animales;
- Procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, material de nidificación, etc.;
- Peso de cada animal al inicio del ensayo;
- Datos de los frotis vaginales de las hembras P antes del inicio del tratamiento (si se han recogido datos en ese momento);
- Registros del emparejamiento de la generación P que indiquen el macho y la hembra de un apareamiento y si este ha tenido éxito;
- Registros de la camada de origen de los adultos de la generación F₁;

Condiciones del ensayo:

- Justificación de la selección de las dosis;
- Datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos y concentración obtenida;
- Estabilidad y homogeneidad del preparado en el vehículo o portador (por ejemplo, alimentos, agua de bebida), en la sangre o en la leche, en las condiciones de utilización y almacenamiento entre utilizaciones;
- Datos sobre la administración de la sustancia problema;
- Conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a la dosis alcanzada (mg/kg peso corporal y por día), si procede;
- Detalles de la calidad de los alimentos y del agua (incluida la composición de la dieta, si se conoce);
- Descripción detallada de los procedimientos de aleatorización en la selección de crías para su eliminación y para su asignación a los grupos de ensayo;
- Condiciones ambientales;
- Lista del personal del estudio, incluida su formación profesional.

Resultados (resumen y datos individuales por sexo y dosis):

- Consumo de alimentos, consumo de agua si se ha medido, rendimiento alimentario (ganancia de peso corporal por gramo de alimentos consumidos, salvo durante el período de cohabitación y la lactancia), y consumo de la sustancia problema (en caso de administración con los alimentos o el agua de bebida) de los animales P y F₁;
- Datos relativos a la absorción (si se dispone de ellos);
- Datos de peso corporal de los animales P;
- Datos sobre el peso corporal de los animales F₁ seleccionados tras el destete;
- Fecha de las muertes sobrevenidas durante el estudio o si los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;
- Naturaleza, gravedad y duración de los signos clínicos (reversibles o no);
- Datos de los análisis hematológicos, de orina y de química clínica, incluidas las hormonas TSH y T4;
- Análisis fenotípico de las células del bazo (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales);
- Estudio de las células de la médula ósea;
- Datos de la respuesta tóxica;
- Número de hembras P y F₁ con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;
- Tiempo del apareamiento (intervalo precoital, que es el número de días entre emparejamiento y apareamiento);
- Efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, incluidos los números y porcentajes de los animales que han llevado a cabo el apareamiento, la gestación, el parto y la lactancia, de los machos que han provocado una gestación, de las hembras con signos de distocia o parto difícil o prolongado;
- Duración de la gestación y, si se dispone de este dato, del parto;
- Número de implantaciones, tamaño de la camada y porcentaje de crías machos;

- Número y porcentaje de pérdidas postimplantación, de nacidos vivos y de mortinatos;
- Datos del peso de la camada y del peso de las crías (machos, hembras y combinados), el número de animales con retraso si se ha determinado;
- Número de crías con anomalías visibles macroscópicamente;
- Efectos tóxicos o de otro tipo sobre la progenie, el crecimiento postnatal, la viabilidad, etc.;
- Datos sobre puntos de referencia físicos evaluados en las crías y otros datos relativos al desarrollo postnatal;
- Datos sobre la maduración sexual de los animales F₁;
- Datos sobre las observaciones funcionales realizadas en las crías y los adultos, según proceda;
- Peso corporal en el momento del sacrificio y peso absoluto y relativo de los órganos de los animales P y de los adultos F₁;
- Observaciones de la autopsia;
- Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas;
- Número total de espermatozoides en la cola del epidídimo, porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, porcentaje de espermatozoides de morfología normal y porcentaje de espermatozoides con cada anomalía detectada, correspondientes a los machos P y F₁;
- Número y fases de maduración de los folículos contenidos en los ovarios de las hembras P y F₁, en su caso;
- Recuento de cuerpos lúteos en los ovarios de las hembras F₁;
- Tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Parámetros de la cohorte 2:

- Descripción detallada de los procedimientos utilizados para normalizar las observaciones y los procedimientos, así como las definiciones operativas para asignar puntuación a las observaciones;
- Lista de todos los procedimientos de ensayo utilizados y justificación de su empleo;
- Datos de los procedimientos utilizados para los estudios conductuales/funcionales, neuropatológicos y morfométricos, con información y detalles sobre los dispositivos automáticos;
- Procedimientos para calibrar y garantizar la equivalencia de los dispositivos y el reparto equilibrado de los grupos de tratamiento en los procedimientos de ensayo;
- Breve justificación de las decisiones que impliquen un juicio profesional;
- Descripción detallada de todas las observaciones conductuales/funcionales, neuropatológicas y morfométricas por sexo y grupo de dosis, incluidos tanto los aumentos como los descensos respecto a los controles;
- Peso del encéfalo;
- Eventuales diagnósticos derivados de lesiones y signos neurológicos, incluidas las enfermedades o procesos naturales;
- Imágenes de observaciones modelo;
- Imágenes de baja resolución para evaluar la homología de las secciones empleadas en relación con la morfometría;
- Tratamiento estadístico de los resultados, incluidos los modelos estadísticos utilizados para analizar los datos, y los resultados, con independencia de que sean significativos o no;
- Relación de otros eventuales efectos tóxicos con la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia problema, por sexo y grupo de dosis;
- Impacto de cualquier información toxicocinética sobre las conclusiones;
- Datos que apoyan la fiabilidad y sensibilidad del método de ensayo (es decir, datos de resultados positivos y de controles históricos);
- Eventual relación entre efectos neuropatológicos y funcionales;
- NOAEL o dosis de referencia para las madres y los descendientes, por sexo y grupo de dosis;
- Discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluidas la conclusión de si la sustancia problema ha provocado neurotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

Parámetros de la cohorte 3:

- Títulos de anticuerpos de tipo IgM en el suero (sensibilización a SRBC o a KLH) o unidades de PFC en el bazo en respuesta a la IgM (sensibilización a SRBC);
- El comportamiento del ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T (TDAR) debe confirmarse como parte del proceso de optimización por el laboratorio que establezca el ensayo por primera vez, y periódicamente (por ejemplo, una vez al año) por todos los laboratorios;
- Discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluidas la conclusión de si la sustancia problema ha provocado inmunotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

*Discusión de los resultados**Conclusiones, incluidos los valores del NOAEL para efectos sobre los padres y sobre la progenie*

También debe incluirse la eventual información no obtenida durante el estudio, pero que sea útil para la interpretación de los resultados (por ejemplo, semejanzas con los efectos de agentes neurotóxicos conocidos).

Interpretación de los resultados

80. Un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación proporciona información sobre los efectos de la exposición continuada a una sustancia durante todas las fases del ciclo reproductivo, según sea necesario. En particular, el estudio proporciona información sobre el aparato reproductor, y sobre el desarrollo, el crecimiento, la supervivencia y los parámetros funcionales de las crías hasta el DPN 90.
81. La interpretación de los resultados del estudio debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia, incluidas las propiedades fisicoquímicas, toxicocinéticas y toxicodinámicas, la información disponible pertinente sobre análogos estructurales, y los resultados de estudios de toxicidad realizados previamente con la sustancia problema (por ejemplo, toxicidad aguda, toxicidad tras administración continuada, estudios del mecanismo y estudios para evaluar si se producen diferencias cualitativas y cuantitativas importantes en las propiedades metabólicas *in vivo* o *in vitro* de una especie a otra). Si es posible, los resultados de la autopsia macroscópica y del pesaje de los órganos deben interpretarse a la luz de las observaciones realizadas en otros estudios con administración continuada. La disminución del crecimiento de los descendientes podría considerarse en relación con la influencia de la sustancia problema sobre la composición de la leche (29).

Cohorte 2 (neurotoxicidad para el desarrollo)

82. Los resultados de los estudios neuroconductuales y neuropatológicos deben interpretarse en el contexto de todas las observaciones realizadas, utilizando un planteamiento basado en la ponderación de las pruebas con el juicio de los expertos. Deben ser objeto de discusión las pautas de las eventuales observaciones conductuales o morfológicas, así como las pruebas de una relación dosis-respuesta. Debe incluirse en esta caracterización la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los estudios epidemiológicos o los informes de casos humanos, y los estudios con animales de experimentación (por ejemplo, datos de toxicocinética, información sobre la relación estructura-actividad, datos de otros estudios de toxicidad). La evaluación de los datos debe incluir una discusión de la significación tanto biológica como estadística. La evaluación debe incluir la eventual relación que pueda existir entre las alteraciones neuropatológicas y conductuales observadas. Para obtener orientaciones sobre la interpretación de los resultados de neurotoxicidad para el desarrollo, véanse el método de ensayo B.53 (35) y Tyl *et al.*, 2008 (31).

Cohorte 3 (inmunotoxicidad para el desarrollo)

83. La supresión o el refuerzo de la función inmunológica según lo evaluado mediante el ensayo TDAR (respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T) debe valorarse en el contexto de todas las observaciones realizadas. La significación del resultado del ensayo TDAR puede reforzarse con el apoyo de otros efectos sobre indicadores relacionados con factores inmunológicos (por ejemplo, estudio de las células de la médula ósea, el pesaje y el examen histopatológico de los tejidos linfáticos, la distribución de las subpoblaciones de linfocitos). Los efectos establecidos mediante el ensayo TDAR pueden ser menos significativos en caso de que se observen otros efectos tóxicos a menores concentraciones de exposición.
84. Debe consultarse el documento de orientación de la OCDE 43 para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de neurotoxicidad y toxicidad para la reproducción (26).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), "A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment", *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. LeViness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), "Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets", *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), "Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group", *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), "Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment", *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), "Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey", *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), "Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). "Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats-overview of the studies", *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), "Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology", *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies", *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), "Cycles and Seasons", in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), "Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat", *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), "Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), "Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
 - (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
 - (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
 - (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
 - (26) OCDE (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OCDE, París.
 - (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
 - (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), "A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today", *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
 - (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), "Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
 - (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), "Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats", *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
 - (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), "Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints", *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
 - (32) OCDE (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, París.
 - (33) Capítulo B.43 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad en roedores.
 - (34) OCDE (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, París.
 - (35) Capítulo B.53 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad para el desarrollo
 - (36) Capítulo B.54 del presente anexo, Bioensayo uterotrófico con roedores: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades estrogénicas.
 - (37) Capítulo B.55 del presente anexo, Bioensayo de Hershberger con ratas: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades (anti)androgénicas.
 - (38) OCDE (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OCDE, París.
 - (39) OCDE (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OCDE, París.
 - (40) OCDE (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OCDE, París.
-

Apéndice 1

Medidas y observaciones recogidas en la batería de observaciones funcionales (cohorte 2A)

En la jaula de alojamiento y en campo abierto	Con la manipulación	Fisiológicas
Postura	Facilidad para sacar al animal	Temperatura
Movimientos clónicos y tónicos involuntarios	Facilidad de manipulación	Peso corporal
Cierre palpebral	Tono muscular	Reflejo pupilar
Piloerección	Respuesta a la aproximación	Tamaño de la pupila
Salivación	Respuesta al contacto	
Lagrimo	Respuesta auditiva	
Vocalizaciones	Respuesta al pellizco de la cola	
Encabritamiento	Reflejo de enderezamiento	
Anomalías de la marcha	Ensanchamiento del pie al tomar contacto con el suelo	
Nivel de alerta	Fuerza de prensión de las patas delanteras	
Estereotipias	Fuerza de prensión de las patas traseras	
Comportamientos anómalos		
Manchas		
Anomalías respiratorias		

Apéndice 2

Definiciones

Sustancia: Sustancia o mezcla.

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

B.57. ENSAYO DE ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS H295R

INTRODUCCIÓN

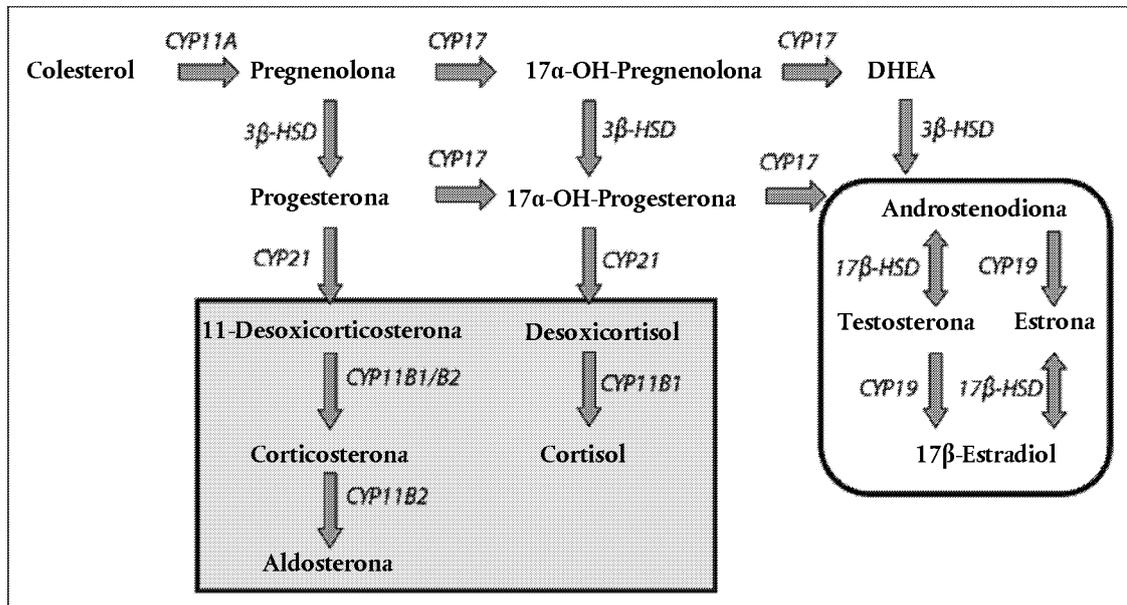
1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 456 (2011). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos. El “OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) de 2002 comprende cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica (1). El ensayo de esteroidogénesis en células H295R *in vitro* (ensayo H295R) descrito en el presente método de ensayo utiliza una línea celular de adenocarcinoma humano (células NCI-H295R) y constituye un ensayo *in vitro* de nivel 2 que aporta datos sobre el mecanismo y que puede utilizarse con fines de cribado y de asignación de prioridades. La elaboración y la normalización del ensayo para el cribado de efectos de las sustancias sobre la esteroidogénesis, específicamente la producción de 17 β -estradiol (E2) y de testosterona (T), se llevaron a cabo en un proceso multifásico. El ensayo H295R está optimizado y validado (2)(3)(4)(5).
2. El objetivo del ensayo de esteroidogénesis H295R es detectar sustancias que afecten a la producción de E2 y de T. El ensayo H295R se propone identificar sustancias xenobióticas cuyo sitio diana sean los componentes endógenos que constituyen la ruta bioquímica intracelular iniciada con la secuencia de reacciones a partir del colesterol para producir E2 o T. El ensayo H295R no tiene por objeto identificar sustancias que afecten a la esteroidogénesis actuando sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG). Su finalidad es proporcionar una respuesta de tipo SÍ/NO en lo que se refiere a la posibilidad de que una sustancia induzca o inhiba la producción de T y E2; sin embargo, es posible obtener resultados cuantitativos en algunos casos (véanse los puntos 53 y 54). Los resultados del ensayo se expresan como cambios relativos en la producción hormonal, respecto a los controles de disolvente. El ensayo no pretende ofrecer información sobre el mecanismo específico relativo a la interacción de la sustancia problema con el sistema endocrino. Se han realizado investigaciones con la línea celular para identificar los efectos sobre ciertas enzimas y hormonas intermedias, tales como la progesterona (2).
3. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice. En los apéndices I-III del documento de la OCDE “Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production” se incluye un protocolo detallado con instrucciones sobre cómo preparar las soluciones, cultivar las células y realizar diversos aspectos del ensayo (4).

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. Hay cinco enzimas diferentes que catalizan seis reacciones diferentes de la biosíntesis de hormonas esteroideas sexuales. La conversión enzimática de colesterol en pregnenolona por la enzima CYP11A, que es del grupo del citocromo P450 (CYP) y que separa la cadena lateral del colesterol, constituye la etapa inicial de una serie de reacciones bioquímicas que culmina en la síntesis de los productos finales esteroideos. En función del orden de las dos reacciones siguientes, el proceso de esteroidogénesis se divide en dos caminos, la vía de los Δ^5 -hidroxiesteroides y la vía de los Δ^4 -cetoesteroides, que convergen en la producción de androstenodiona (figura 1).
5. La androstenodiona se convierte en testosterona (T) por la acción de la 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD). La testosterona es tanto un producto intermedio como una hormona final. En los machos, la T puede convertirse en dihidrotestosterona (DHT) por la 5 α -reductasa, que se encuentra en las membranas celulares, la membrana nuclear y el retículo endoplásmico de los tejidos diana de la acción androgénica, como la próstata y las vesículas seminales. La DHT es significativamente más potente como andrógeno que la T y también se considera una hormona final. El ensayo H295R no mide la DHT (véase el punto 10).
6. La enzima de la vía esteroidogénica que convierte las sustancias androgénicas en sustancias estrogénicas es la aromatasas (CYP19). Esta transforma la T en 17 β -estradiol (E2) y la androstenodiona en estrona. Tanto el E2 como la T se consideran hormonas finales de la vía esteroidogénica.
7. La especificidad de la actividad liásica de la CYP17 difiere en cuanto a los sustratos intermedios en las distintas especies. En la especie humana, la enzima favorece los sustratos de la vía de los Δ^5 -hidroxiesteroides (pregnenolona), mientras que en la rata se ven favorecidos los sustratos de la vía de los Δ^4 -cetoesteroides (progesterona) (19). Tales diferencias en la actividad liásica de la CYP17 pueden explicar algunas diferencias según las especies en cuanto a la respuesta a sustancias que alteran la esteroidogénesis *in vivo* (6). Se ha comprobado que las células H295 reflejan muy bien la expresión enzimática suprarrenal y el patrón de producción de esteroides de los adultos de nuestra especie (20), pero se sabe que expresan enzimas tanto de la vía de los Δ^5 -hidroxiesteroides como de la de los Δ^4 -cetoesteroides para la síntesis de andrógenos (7)(11)(13)(15).

Figura 1

Vía esteroidogénica de las células H295R



Nota:

Las enzimas están en cursiva, las hormonas, en negrita, y las flechas indican la dirección de la síntesis. El fondo gris indica vías/productos de la categoría de los corticoesteroides. Las vías/productos de la categoría de los esteroides sexuales están en el círculo. CYP = citocromo P450; HSD = hidroxisteroide-deshidrogenasa; DHEA = deshidroepiandrosterona.

8. La línea celular de adenocarcinoma H295R humano es útil como modelo *in vitro* para la investigación de efectos sobre la síntesis de hormonas esteroideas (2)(7)(8)(9)(10). La línea celular H295R expresa los genes que codifican todas las enzimas clave para la esteroidogénesis indicadas más arriba (11)(15) (figura 1). Se trata de una característica única porque la expresión *in vivo* de estos genes es específica de ciertos tejidos y de ciertas fases del desarrollo, y lo normal es que no haya un solo tejido o una sola fase del desarrollo que exprese todos los genes que participan en la esteroidogénesis (2). Las células H295R tienen características fisiológicas de las células suprarrenales sin diferenciación zonal de los fetos humanos (11). Las células representan un sistema *in vitro* único, ya que tienen la capacidad de producir todas las hormonas esteroideas que se encuentran en la corteza suprarrenal y en las gónadas de los adultos, lo que permite realizar ensayos sobre los efectos en la síntesis de corticoesteroides y en la producción de hormonas esteroideas sexuales, como los andrógenos y los estrógenos, aunque el ensayo está validado solo para detectar T y E2. Los cambios detectados por el sistema de ensayo en forma de alteración de la producción de T y E2 pueden ser resultado de una multitud de distintas interacciones de las sustancias problema con las funciones de la esteroidogénesis que se expresan en las células H295R. Entre estas se incluyen la modulación de la expresión, de la síntesis o de la función de las enzimas que participan en la producción, transformación o eliminación de las hormonas esteroideas (12)(13)(14). La inhibición de la producción hormonal puede deberse a una unión competitiva directa a una enzima de la vía, al impacto sobre cofactores tales como el NADPH (fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido) y el cAMP (monofosfato de adenosina cíclico), o al incremento del metabolismo de los esteroides o a la supresión de la expresión génica de algunas enzimas de la vía de la esteroidogénesis. Aunque la inhibición puede ser función de procesos tanto directos como indirectos relacionados con la producción de hormonas, la inducción tiene normalmente un carácter indirecto; puede deberse, por ejemplo, a la alteración de cofactores como el NADPH y el cAMP (como en el caso de la forskolina), a la reducción del metabolismo de los esteroides (13) o a la activación de la expresión génica de la esteroidogénesis.
9. El ensayo H295R ofrece varias ventajas:
 - Permite la detección tanto de incrementos como de disminuciones de la producción de T y de E2.
 - Permite la evaluación directa del efecto potencial de una sustancia sobre la viabilidad celular y la citotoxicidad. Esta es una característica importante, ya que permite discriminar entre los efectos debidos a la citotoxicidad y los debidos a la interacción directa de las sustancias con las vías esteroidogénicas, lo cual no es posible en sistemas de tejidos explantados que están compuestos por múltiples tipos de células con sensibilidades y funcionalidades diferentes;

- No exige la utilización de animales;
 - La línea celular H295R está disponible en el comercio.
10. Las limitaciones principales del ensayo son las siguientes:
- Su capacidad metabólica es desconocida, pero probablemente es bastante limitada; por lo tanto, es probable que las sustancias que tienen que activarse metabólicamente pueden pasarse por alto en este ensayo.
 - Dado que proceden del tejido suprarrenal, las células H295R poseen las enzimas capaces de producir gluco y mineralocorticoides, así como hormonas sexuales; por tanto, los efectos sobre la producción de gluco y mineralocorticoides pueden influir en los niveles de T y E2 observados en este ensayo.
 - Aquí no se mide la DHT, por lo que no se espera que se detecten las sustancias que inhiben la 5 α -reductasa, en cuyo caso puede utilizarse el ensayo de Hershberger (16).
 - El ensayo H295R no detecta las sustancias que interfieren con la esteroidogénesis por afectar al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG), ya que esto solo puede estudiarse en animales intactos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El objetivo del ensayo es la detección de las sustancias que afectan a la producción de T y de E2. La T es también un producto intermedio de la vía que lleva al E2. El ensayo puede detectar sustancias que característicamente inhiben o inducen enzimas de la vía de la esteroidogénesis.
12. El ensayo suele efectuarse en condiciones normales de cultivo celular, en placas de cultivo de 24 pocillos. También pueden utilizarse placas de otros tamaños para realizar el ensayo; sin embargo, la siembra y las condiciones experimentales deben adaptarse en consecuencia para mantener el cumplimiento de los criterios de comportamiento.
13. Tras un período de aclimatación de 24 h en placas con múltiples pocillos, se exponen las células durante 48 h a siete concentraciones de la sustancia problema, al menos por triplicado. Como controles, negativo y positivos, se aplican el disolvente y un inhibidor y un inductor de la producción de hormonas conocidos, a una concentración fijada. Al final del período de exposición, se retira el medio de cada pocillo. Se analiza la viabilidad celular en cada pocillo inmediatamente después de retirar el medio. Las concentraciones de las hormonas en el medio pueden medirse utilizando una serie de métodos, incluidos equipos disponibles en el comercio para la medición de hormonas, o técnicas instrumentales como la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). Los datos se expresan como el factor multiplicador del cambio respecto al control del disolvente y como la concentración con efecto mínimo observado (LOEC). Si el ensayo es negativo, la mayor concentración utilizada en el ensayo se recoge como la concentración sin efecto observado (NOEC). Las conclusiones sobre la capacidad de una sustancia para afectar a la esteroidogénesis deben basarse, como mínimo, en dos tandas de ensayos independientes. La primera tanda de ensayos puede servir para determinar la gama de concentraciones, que se ajustan posteriormente para las tandas 2 y 3, en su caso, si se detectan problemas de solubilidad o de citotoxicidad, o si la actividad de la sustancia parece estar al final de la gama de concentraciones empleada en el ensayo.

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO

Línea celular

14. Las células NCI-H295R se pueden conseguir comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC) previa firma de un acuerdo de transferencia de material (ATM) ⁽¹⁾.

Introducción

15. Debido a los cambios en la capacidad de producción de E2 de las células al aumentar la edad o el número de pases (2), es necesario que las células se cultiven según un protocolo específico, antes de utilizarse, y hay que anotar el número de pases desde la descongelación de las células, así como el número de pases al que las células se han congelado y colocado en nitrógeno líquido para su almacenamiento. El primer número indica el número real de pases celulares y el segundo número es el de pases al que las células se han congelado y almacenado. Por ejemplo, unas células congeladas después del pase 5, y que luego se han descongelado y sembrado tres veces (4 pases contando las células recién descongeladas como pase 1) después de haberse cultivado de nuevo se etiquetarían como pase 4.5. En el apéndice I del informe de validación se ilustra un ejemplo del sistema de numeración (4).
16. Se utiliza un medio de partida como base para los medios suplementado y de congelación. El medio suplementado es un componente necesario para el cultivo de las células. El medio de congelación está concebido específicamente para permitir la congelación de las células para su almacenamiento a largo plazo sin problemas. Antes de

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

su utilización, debe analizarse el suero Nu-serum (o un suero comparable de propiedades similares del que se haya demostrado que sirve para producir datos que cumplen los requisitos de control de calidad y de comportamiento del ensayo), que es un componente de los medios suplementados, en cuanto a sus concentraciones de base de T y de E2. En el apéndice II del informe de validación se describe la preparación de estas soluciones (4).

17. Tras el inicio de un cultivo de células H295R a partir de un lote original de la ATCC, hay que cultivar las células a lo largo de cinco pases (es decir, hay que resembrarlas 4 veces). Las células del pase 5 se congelan en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Antes de congelar las células, se cultiva una muestra de células del pase 4 anterior en una placa de control de calidad (véanse los puntos 36 y 37) para verificar si la producción basal de hormonas y la respuesta a las sustancias de control positivo cumplen los criterios de control de calidad del ensayo, definidos en el cuadro 5.
18. Las células H295R deben cultivarse, congelarse y almacenarse en nitrógeno líquido para asegurarse de que siempre hay células del paso/edad apropiado disponibles para su cultivo y utilización. El número máximo de pases tras poner en cultivo un lote nuevo ⁽¹⁾ o congelado ⁽²⁾ de células aceptable para su uso en el ensayo H295R no debe superar los 10. Por ejemplo, los pases aceptables para los cultivos de células de un lote congelado en el pase 5 van de 4.5 a 10.5. Con las células cultivadas a partir de estos lotes congelados, debe seguirse el procedimiento contemplado en el punto 19. Estas células deben cultivarse durante al menos cuatro (4) pases adicionales (pase 4.5) antes de utilizarse en el ensayo.

Cultivo de células a partir de material congelado

19. El procedimiento para cultivar células a partir de material congelado debe utilizarse en los casos en que se toma un lote nuevo de células de su almacenamiento en nitrógeno líquido para su cultivo y utilización en el ensayo. Los detalles de este procedimiento son los indicados en el apéndice III del informe de validación (4). Las células se retiran de su almacenamiento en nitrógeno líquido, se descongelan rápidamente, se colocan en medio suplementado en un tubo de centrifuga, se centrifugan a temperatura ambiente, se vuelven a suspender en medio suplementado, y se transfieren a un matraz de cultivo. El medio debe cambiarse el día siguiente. Las células H295R se cultivan en estufa a 37 °C en atmósfera de aire con un 5 % de CO₂, y el medio se renueva 2-3 veces por semana. Cuando las células presentan una confluencia del 85-90 % aproximadamente, deben resembrarse. La resiembra de las células es necesaria para garantizar su salud y crecimiento y para mantenerlas con vistas a la realización de bioensayos. Las células se lavan tres veces con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS, sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y se liberan del matraz de cultivo mediante la adición de una enzima adecuada de separación como, por ejemplo, la tripsina, en PBS (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺). Inmediatamente después de que las células se hayan desprendido del matraz de cultivo, debe detenerse la acción de la enzima con la adición de medio suplementado en la proporción de tres veces el volumen que se ha utilizado para el tratamiento enzimático. Las células se ponen en un tubo de centrifuga y se centrifugan a temperatura ambiente, el sobrenadante se elimina y el precipitado de células se vuelve a suspender en medio suplementado. Se coloca en el nuevo matraz de cultivo la cantidad apropiada de suspensión de células. La cantidad de suspensión de células debe ajustarse de forma que las células se hagan confluentes en el plazo de 5 a 7 días. La proporción recomendada de subcultivo es de 1:3 a 1:4. La placa debe etiquetarse cuidadosamente. Las células están entonces dispuestas para utilizarse en el ensayo y las células excedentarias deben congelarse en nitrógeno líquido como se describe en el punto 20.

Congelación de las células H295R (preparación para su almacenamiento en nitrógeno líquido)

20. A fin de preparar las células H295R para su congelación, el procedimiento descrito anteriormente para resembrar las células debe seguirse hasta la etapa de nueva suspensión del precipitado de células del fondo del tubo de centrifuga. En este caso, el precipitado de células se vuelve a suspender en medio de congelación. La suspensión se transfiere a un tubo criogénico, etiquetado de forma apropiada, y se congela a -80 °C durante 24 horas, tras lo cual el tubo criogénico se transfiere a nitrógeno líquido para su almacenamiento. Los detalles de este procedimiento son los indicados en el apéndice III del informe de validación (4).

Siembra en placas y preincubación de las células para el ensayo

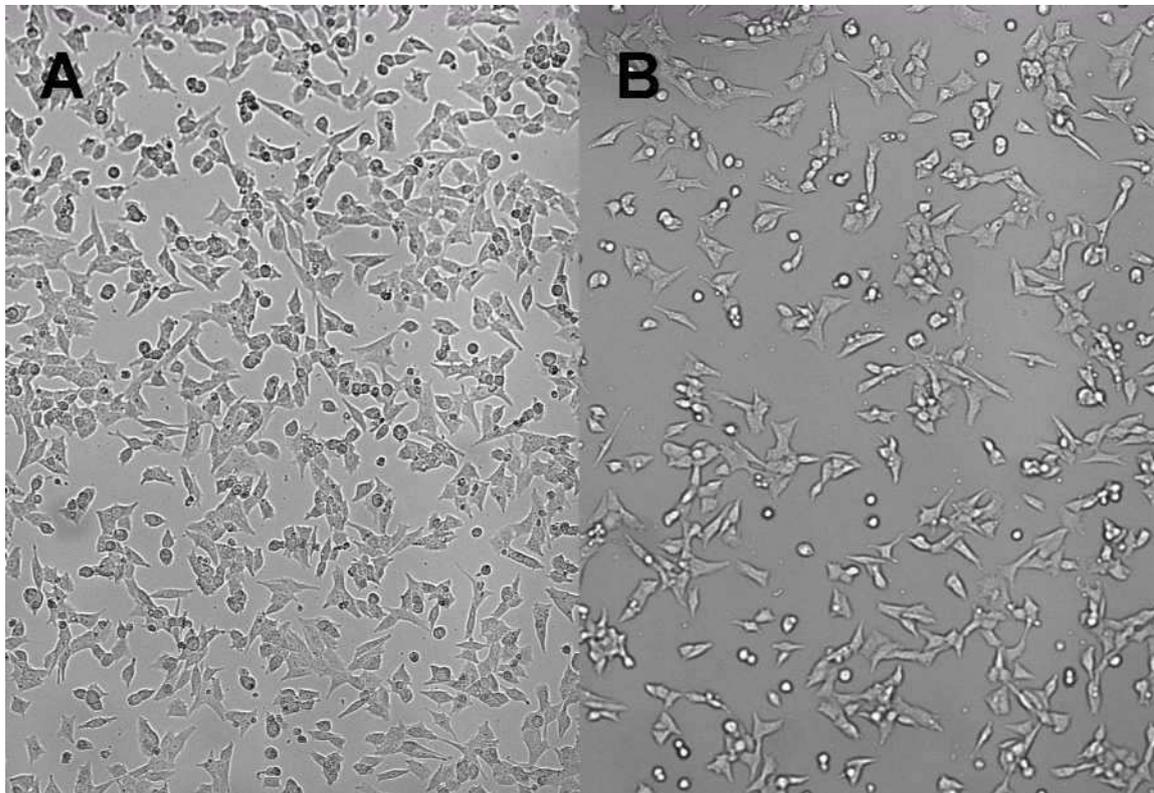
21. El número necesario de placas de 24 pocillos, preparadas como se indica en el punto 19, dependerá del número de sustancias que se hayan de someter al ensayo y de la confluencia de las células en los matraces de cultivo. Como norma general, un solo matraz de cultivo (75 cm²) de células con una confluencia del 80-90 % proporciona bastantes células para poblar de 1 a 1,5 placas (de 24 pocillos) con una densidad objetivo de 200 000 a 300 000 células por ml de medio, que resulta en una confluencia aproximada del 50-60 % en los pocillos al cabo de 24 horas (figura 2). Esta es normalmente la densidad celular óptima para la producción de hormonas en el ensayo. Con densidades superiores, se altera el patrón de producción de T y de E2. Antes de realizar el ensayo por primera vez, se recomienda probar diferentes densidades de inóculo, entre 200 000 y 300 000 células por ml, y seleccionar para el resto de los experimentos la densidad que procure una confluencia del 50-60 % en el pocillo al cabo de 24 horas.

⁽¹⁾ Por "lote nuevo" se entiende un lote de células recién recibido de la ATCC.

⁽²⁾ Por "lote congelado" se entiende el de células que se han cultivado y congelado previamente en un laboratorio distinto de la ATCC.

Figura 2

Microfotografías de células H295R con una densidad de inóculo del 50 % en una placa de cultivo de 24 pocillos a las 24 horas, tomadas en el borde (A) y en el centro (B) de un pocillo



22. Con pipeta, se retira el medio del matraz de cultivo, y las células se lavan 3 veces con PBS estéril (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Se añade una solución enzimática (en PBS) para desprender las células del matraz de cultivo. Tras un tiempo adecuado para que las células se desprendan, debe detenerse la acción de la enzima con la adición de medio suplementado en la proporción de tres veces el volumen que se ha utilizado para el tratamiento enzimático. Las células se ponen en un tubo de centrifuga, se centrifugan a temperatura ambiente, el sobrenadante se elimina y el precipitado de células se vuelve a suspender en medio suplementado. La densidad celular se calcula utilizando, por ejemplo, un hemocitómetro o un contador celular. La suspensión celular debe diluirse hasta obtener la deseada densidad de siembra en placa y mezclarse bien para conseguir una densidad celular homogénea. Las células deben ponerse en las placas a razón de 1 ml de la suspensión celular por pocillo, y las placas y pocillos deben etiquetarse. Las placas sembradas se incuban a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de aire con 5 % de CO_2 durante 24 horas para que las células puedan adherirse a los pocillos.

REQUISITOS DE CONTROL DE CALIDAD

23. Es fundamental que se pongan en los pocillos los volúmenes exactos de las soluciones y muestras al realizar el ensayo, ya que estos volúmenes determinan las concentraciones utilizadas para calcular los resultados del ensayo.
24. Antes de iniciar el cultivo celular y cualesquiera otras pruebas posteriores, cada laboratorio debe demostrar la sensibilidad de su sistema de medición de hormonas (puntos 29-31).
25. Si se van a aplicar sistemas de medición de hormonas que utilizan anticuerpos, debe analizarse antes de iniciar el ensayo el potencial de las sustancias problema para interferir con el sistema de medición aplicado para cuantificar la T y el E2 como se indica en el punto 32.

26. El DMSO es el disolvente recomendado para este ensayo. Si se utiliza otro disolvente, debe determinarse lo siguiente:
- la solubilidad de la sustancia problema, de la forskolina y del procloraz en el disolvente, así como
 - la citotoxicidad en función de la concentración de disolvente.

Se recomienda que la concentración máxima permisible de disolvente no supere una dilución de 10 veces la menor concentración citotóxica del disolvente.

27. Antes de llevar a cabo el ensayo por primera vez, el laboratorio debe realizar un experimento de evaluación de la aptitud, en el que se demuestre que el laboratorio es capaz de mantener y lograr unos cultivos celulares adecuados y las condiciones experimentales necesarias para los ensayos de sustancias, como se describe en los puntos 33-35.
28. Cuando se inicie un ensayo con un lote nuevo de células, debe aplicarse el procedimiento a una placa de control antes de utilizar el lote nuevo, a fin de evaluar el comportamiento de las células, como se describe en los puntos 36 y 37.

Comportamiento del sistema de medición de hormonas

Sensibilidad, exactitud, precisión y reactividad cruzada con la matriz de muestra

29. Cada laboratorio puede utilizar el sistema de medición de hormonas que prefiera para el análisis de la producción de T y de E2 por las células H295R siempre que cumpla los criterios de comportamiento, incluido el límite de cuantificación (LC). Los valores de este límite son, en principio, 100 pg/ml para T y 10 pg/ml para E2, establecidos según los niveles hormonales basales observados en los estudios de validación. No obstante, puede ser apropiado aplicar niveles superiores o inferiores en función de los niveles hormonales basales obtenidos en el laboratorio que realice el ensayo. Antes de iniciar la placa de control de calidad y las tandas de ensayo, el laboratorio debe demostrar que el sistema hormonal que se va a utilizar puede medir las concentraciones hormonales en el medio suplementado, con la suficiente exactitud y precisión para cumplir los criterios de control de calidad especificados en los cuadros 1 y 5, mediante el análisis del medio suplementado al que se ha añadido un control interno de hormona. Al medio suplementado se le deben añadir al menos tres concentraciones de cada hormona (por ejemplo, 100, 500 y 2 500 pg/ml de T; 10, 50 y 250 pg/ml de E2; o también, como concentraciones añadidas más bajas de T y de E2, pueden usarse las concentraciones más bajas posibles según los límites de detección del sistema de medición hormonal elegido), y a continuación se analiza. Las concentraciones hormonales medidas en muestras no extraídas no deben alejarse más del 30 % de las concentraciones nominales, y la variación entre mediciones replicadas de la misma muestra no debe superar el 25 % (véanse también en el cuadro 8 criterios adicionales de control de calidad). Si se cumplen estos criterios de control de calidad, se supone que el sistema seleccionado de medición hormonal es suficientemente exacto, preciso y no presenta reactividad cruzada con los componentes del medio (matriz de la muestra) de modo que pudiera preverse una influencia significativa sobre el resultado del ensayo. En tal caso, no es necesario proceder a ninguna extracción de las muestras antes de realizar las mediciones hormonales.
30. En caso de que no se cumplan los criterios de control de calidad de los cuadros 1 y 8, puede estar dándose un efecto matricial significativo, y debe llevarse a cabo un experimento con medio al que se ha añadido la hormona y luego se ha sometido a extracción. En el apéndice II del informe de validación se describe un ejemplo de procedimiento de extracción (4). Las mediciones de las concentraciones hormonales en las muestras extraídas deben hacerse por triplicado (1). Si se puede demostrar que, previa extracción, los componentes del medio no interfieren con el método de detección de las hormonas según lo definido por los criterios de control de calidad, todos los experimentos posteriores deben realizarse utilizando muestras extraídas. Si los criterios de control de calidad no pueden cumplirse ni siquiera después de efectuar la extracción, es que el sistema de medición hormonal utilizado no es adecuado para los fines del ensayo de esteroidogénesis H295R, y hay que emplear un método alternativo de detección hormonal.

Curva patrón

31. Las concentraciones hormonales de los controles de disolvente (CD) deben situarse en la porción lineal de la curva patrón. Es preferible que los valores de CD queden cerca del centro de la porción lineal para garantizar que puedan medirse la inducción y la inhibición de la síntesis de las hormonas. Las diluciones del medio (o extractos) que hayan de medirse deben seleccionarse en consecuencia. La relación lineal debe determinarse mediante un método estadístico adecuado.

Prueba de interferencia de las sustancias

32. Si para medir las hormonas van a utilizarse sistemas con intervención de anticuerpos, tales como los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y los radioinmunoanálisis (RIA), debe probarse cada sustancia en cuanto a su posible interferencia con el sistema de medición hormonal que vaya a emplearse, antes del inicio de los ensayos propiamente dichos de la sustancia [apéndice III del informe de validación (4)], ya que algunas sustancias pueden interferir con estos sistemas (17). Si se produce una interferencia, esto es, un aumento ≥ 20 % de la producción basal de hormonas T y/o E2, según lo determinado por el análisis hormonal, debe llevarse a cabo la prueba de

(1) Nota: Si es necesario realizar la extracción, se efectúan tres mediciones replicadas de cada extracto. Cada muestra se extrae una sola vez.

interferencia del sistema de medición hormonal con la sustancia [tal como se describe en la sección 5.0 del apéndice III del informe de validación (4)] con todas las diluciones de la solución madre de la sustancia problema, a fin de identificar la dosis umbral a partir de la que se produce una interferencia significativa ($\geq 20\%$). Si la interferencia es inferior al 30 %, es posible corregir los resultados para tener en cuenta la interferencia. Si la interferencia es superior al 30 %, los datos correspondientes a esas concentraciones son inválidos y hay que descartarlos. En caso de que haya interferencia significativa de una sustancia problema con un sistema de medición hormonal a más de una concentración no citotóxica, debe utilizarse un sistema de medición hormonal diferente. Con el fin de evitar la interferencia de las sustancias contaminantes, se recomienda que se extraigan las hormonas del medio utilizando un disolvente adecuado; pueden encontrarse posibles métodos en el informe de validación (4).

Cuadro 1

Crterios de comportamiento de los sistemas de medición hormonal

Parámetro	Criterio
Sensibilidad del método de medición	Límite de cuantificación (LC) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Eficacia de la extracción hormonal (solo cuando haga falta efectuar la extracción)	Las tasas de recuperación medias (a partir de mediciones triplicadas) de las cantidades añadidas de hormona no deben desviarse en más del 30 % de la cantidad añadida.
Interferencia con la sustancia (solo para sistemas que utilizan anticuerpos)	No debe haber reactividad cruzada importante ($\geq 30\%$ de la producción basal de la hormona respectiva) con ninguna de las hormonas producidas por las células ^(b) ^(c) .

^(a) Nota: Los límites del método de medición se basan en los valores de producción hormonal basal que se recogen en el cuadro 5, y son función del comportamiento. Si se puede conseguir una mayor producción hormonal basal, el límite puede ser mayor.

^(b) Algunos anticuerpos contra la T y el E2 pueden presentar reacción cruzada con la androstenodiona y la estrona, respectivamente, en un porcentaje mayor. En tales casos, no es posible determinar exactamente los efectos sobre la 17 β -HSD. Sin embargo, los datos pueden seguir proporcionando información útil en relación con los efectos sobre la producción de estrógenos o de andrógenos en general. En estos casos, los datos deben expresarse como respuestas androgénicas/estrogénicas, más que como E2 y T.

^(c) Entre estas figuran las siguientes: colesterol, pregnenolona, progesterona, 11-desoxicorticosterona, corticosterona, aldosterona, 17 α -pregnenolona, 17 α -progesterona, desoxicortisol, cortisol, DHEA, androstenodiona, estrona.

Prueba de competencia del laboratorio

33. Antes de ensayar sustancias desconocidas, el laboratorio debe demostrar que tiene capacidad para mantener y lograr unos cultivos celulares adecuados y las condiciones experimentales necesarias para la correcta realización del ensayo, efectuando la prueba de competencia del laboratorio. Dado que el comportamiento de un ensayo está relacionado directamente con el personal del laboratorio que lo lleva a cabo, estos procedimientos deben repetirse parcialmente si se produce algún cambio en el personal del laboratorio.
34. Esta prueba de competencia se efectuará en las mismas condiciones recogidas en los puntos 38 a 40, exponiendo las células a siete concentraciones crecientes de inductores e inhibidores fuertes, moderados y débiles, así como a una sustancia negativa (véase el cuadro 2). En concreto, las sustancias que deben utilizarse son las siguientes: el inductor fuerte forskolina (nº CAS 66575-29-9); el inhibidor fuerte procloraz (nº CAS 67747-09-5); el inductor moderado atrazina (nº CAS 1912-24-9); el inhibidor moderado aminoglutetimida (nº CAS 125-84-8); el inductor débil (producción de E2) e inhibidor débil (producción de T) bisfenol A (nº CAS 80-05-7); y la sustancia negativa gonadotropina coriónica humana (HCG) (nº CAS 9002-61-3), como se indica en el cuadro 2. Se utilizan placas separadas para todas las sustancias siguiendo el formato indicado en el cuadro 6. En cada tanda diaria debe incluirse una placa de control de calidad (cuadro 4, puntos 36-37) para las sustancias de la prueba de competencia.

Cuadro 2

Sustancias de la prueba de competencia y concentraciones de exposición

Sustancia de la prueba de competencia	Concentraciones de ensayo [μ M]
Procloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Sustancia de la prueba de competencia	Concentraciones de ensayo [μM]
Atrazina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimida	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Control de disolvente (DMSO) (0), 1 μl DMSO/pocillo

Las células H295R deben exponerse a las sustancias de la prueba de competencia en placas de 24 pocillos durante la prueba de competencia del laboratorio. Las unidades de concentración son μM para las dosis de todas las sustancias de la prueba. Las sustancias deben aplicarse disueltas en DMSO al 0,1 % v/v por pocillo. Todas las concentraciones de la prueba deben ensayarse en pocillos por triplicado (cuadro 6). Se utilizan placas separadas para cada sustancia. En cada tanda diaria se incluye una placa de control de calidad.

35. Deben efectuarse el análisis de la viabilidad celular y los análisis hormonales según lo establecido en los puntos 42 a 46. El valor umbral (concentración mínima con efecto observado, LOEC) y la decisión sobre la clasificación deben comunicarse y compararse con los valores del cuadro 3. Los datos se consideran aceptables si cumplen el valor umbral de LOEC y la clase de decisión del cuadro 3.

Cuadro 3

Valores umbrales (LOEC) y clases de decisión para las sustancias de la prueba de competencia

	Nº CAS	LOEC [μM]		Clase de decisión	
		T	E2	T	E2
Procloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (Inhibición)	+ (Inhibición)
Forskolina	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (Inducción)	+ (Inducción)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Inducción)	+ (Inducción)
Aminoglutetimida	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibición)	+ (Inhibición)
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibición)	+ (Inducción)
HCG	9002-61-3	N. a.	N. a.	Negativa	Negativa

^(a) +, positiva

N a., no aplicable ya que no debe haber cambios tras la exposición a concentraciones no citotóxicas del control negativo.

Placa de control de calidad

36. La placa de control de calidad se utiliza para verificar el comportamiento de las células H295R en condiciones normales de cultivo, y para establecer una base de datos históricos de las concentraciones hormonales en los controles de disolvente y en los controles positivos y negativos, así como otras medidas de control de calidad a lo largo del tiempo.
- El comportamiento de las células H295R debe evaluarse utilizando una placa de control de calidad para cada lote nuevo de la ATCC o después de utilizar por primera vez una población congelada de células, salvo que se haya efectuado con ese lote de células la prueba de competencia del laboratorio (puntos 32-34).
 - Una placa de control de calidad proporciona una evaluación completa de las condiciones del ensayo (por ejemplo, viabilidad de las células, controles de disolvente, controles negativos y positivos, así como variabilidad intra e inter-ensayos) cuando se estudian las sustancias, y debe formar parte de cada tanda del ensayo.
37. La prueba de control de calidad se efectúa en una placa de 24 pocillos, con los mismos procedimientos de incubación, administración, viabilidad celular/citotoxicidad, extracción hormonal y análisis hormonal que se describen en los puntos 38 a 46 para las sustancias problema. La placa de control de calidad incluye blancos, controles del disolvente y dos concentraciones de un inductor (forskolina, 1, 10 μM) y de un inhibidor (procloraz, 0,1, 1 μM)

conocidos de la síntesis de E2 y de T. Además, se utiliza MeOH en determinados pocillos como control positivo del ensayo de viabilidad o de citotoxicidad. En el cuadro 4 se recoge una descripción detallada del diseño de la placa. En el cuadro 5 se indican los criterios que debe cumplir la placa de control de calidad. Tanto los pocillos de control de disolvente como los pocillos en blanco deben respetar el nivel mínimo de producción hormonal basal de T y de E2.

Cuadro 4

Diseño de la placa de control de calidad para comprobar el comportamiento de las células H295R sin exponer y de las células expuestas a un inhibidor (PRO = procloraz) y a un inductor (FOR = forskolina) conocidos de la producción de E2 y de T. Una vez terminado el experimento de exposición y tras haber retirado el medio, se añade una solución de metanol al 70 % a todos los pocillos de MeOH para servir de control positivo de la citotoxicidad [véase el ensayo de citotoxicidad en el apéndice III del informe de validación (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Blanco ^(a)	Blanco ^(a)	Blanco ^(a)	Blanco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Blanco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Blanco ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

^(a) Las células de los pocillos en blanco solo reciben medio (es decir, sin disolvente).

^(b) El metanol (MeOH) se añade **después** de que haya terminado la exposición y se haya retirado el medio de estos pocillos.

^(c) Control del disolvente DMSO (1 µl/pocillo).

Cuadro 5

Criterios de comportamiento de la placa de control de calidad

	T	E2
Producción hormonal basal en el control del disolvente (CD)	≥ 5 veces el límite de cuantificación	≥ 2,5 veces el límite de cuantificación
Inducción (10 µM de forskolina)	≥ 1,5 veces el CD	≥ 7,5 veces el CD
Inhibición (1 µM de procloraz)	≤ 0,5 veces el CD	≤ 0,5 veces el CD

PROCEDIMIENTO DE EXPOSICIÓN A LAS SUSTANCIAS

38. Las células preincubadas se retiran de la estufa (punto 21) y se observan al microscopio para asegurarse de que están en buenas condiciones (fijación, morfología) antes de la administración de la sustancia.
39. Las células se colocan en una campana de bioseguridad y se retira el medio suplementado, que se sustituye por medio suplementado nuevo (1 ml/pocillo). El DMSO es el disolvente preferido para este método de ensayo. Sin embargo, si existen razones para utilizar otros disolventes, deberá describirse la justificación científica. Se exponen las células a la sustancia problema añadiendo 1 µl de la solución adecuada en DMSO [véase el apéndice II del informe de validación (4)] por ml de medio suplementado (volumen del pocillo). Así se consigue una concentración final del 0,1 % de DMSO en los pocillos. Para garantizar una mezcla adecuada, en general es preferible que

la solución adecuada de la sustancia problema en DMSO se mezcla con medio suplementado para obtener la concentración final deseada en relación con cada dosis, y la mezcla se añade a cada pocillo inmediatamente después de la retirada del medio viejo. Si se utiliza esta opción, la concentración de DMSO (0,1 %) debe ser la misma en todos los pocillos. Los pocillos con las dos mayores concentraciones se someten a evaluación visual utilizando una lupa binocular para detectar la posible formación de precipitados o turbidez, la cual indicaría que la sustancia de ensayo no se ha disuelto completamente. Si se observan estas condiciones (turbidez, formación de precipitados), se examinarán también los pocillos que contengan las concentraciones inmediatamente inferiores (y así sucesivamente) y se excluirán del análisis y evaluación posteriores las concentraciones a las que la solución no sea completa. La placa se vuelve a poner en la estufa a 37 °C en atmósfera de aire con 5 % de CO₂ durante 48 horas. En el cuadro 6 se indica el diseño de la placa de la sustancia problema. Las soluciones 1-7 indican la distribución de las dosis de la sustancia problema en orden creciente.

Cuadro 6

Esquema de las dosis para la exposición de las células H295R a las sustancias problema en una placa de 24 pocillos

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Solución 4	Solución 4	Solución 4
B	Solución 1	Solución 1	Solución 1	Solución 5	Solución 5	Solución 5
C	Solución 2	Solución 2	Solución 2	Solución 6	Solución 6	Solución 6
D	Solución 3	Solución 3	Solución 3	Solución 7	Solución 7	Solución 7

40. Tras 48 horas de exposición, se retiran las placas de la estufa y cada pocillo se observa al microscopio para ver las condiciones de las células (fijación, morfología, grado de confluencia) y los eventuales signos de citotoxicidad. El medio de cada pocillo se divide en dos porciones iguales (de unos 490 µl cada una) que se transfieren a dos tubos distintos, etiquetados de la forma adecuada (una de las alícuotas servirá de muestra de reserva de cada pocillo). Para evitar que las células se desequen, el medio se va retirando al ritmo de una fila o columna a la vez y se va sustituyendo con medio para el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad. Si no se va a medir inmediatamente la viabilidad celular/citotoxicidad, hay que añadir a cada pocillo 200 µl de PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺. Los medios se congelan a - 80 °C hasta que se proceda a analizar las concentraciones hormonales (véanse los puntos 44-46). Si bien la T y el E2 en el medio mantenido a - 80 °C son estables en general durante al menos 3 meses, es necesario documentar la estabilidad de las hormonas durante el almacenamiento en cada laboratorio.
41. Inmediatamente después de retirar el medio, se determina la viabilidad celular/citotoxicidad de cada placa de exposición.

Determinación de la viabilidad celular

42. Para determinar el impacto potencial de la sustancia problema sobre la viabilidad celular puede utilizarse el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad que se prefiera. El ensayo debe ser capaz de proporcionar una medida real del porcentaje de células viables presentes en un pocillo, o ha de demostrarse que es directamente comparable a una función lineal del ensayo Live/Dead® [véase el apéndice III del informe de validación (4)]. Un ensayo alternativo del que se ha demostrado que funciona igual de bien es el ensayo del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil-tetrazolio] (18). La evaluación de la viabilidad celular utilizando los métodos anteriormente mencionados es una medición relativa que no tiene necesariamente una relación lineal con el número absoluto de células de un pocillo. Por lo tanto, el analista debe llevar a cabo en paralelo una evaluación visual subjetiva de cada pocillo, y han de tomarse fotos digitales de los controles de disolvente y de las dos mayores concentraciones no citotóxicas, fotos que deben conservarse para permitir la evaluación posterior de la densidad celular real, en caso de que fuera necesario. Si la inspección visual o el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad parecen indicar un aumento del número de células, habrá que verificar dicho aumento aparente. Si se confirma el aumento del número de células, este extremo debe reflejarse en el informe del ensayo. La viabilidad celular se expresará en relación con la respuesta media en los controles de disolvente, que se considera el 100 % de células viables, y se calcula de la forma adecuada según el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad que se haya empleado. Con el ensayo del MTT se podrá utilizar la fórmula siguiente:

% células viables = (respuesta en el pocillo – respuesta media en los pocillos tratados con MeOH [= mortalidad del 100 %]) ÷ (respuesta media en los pocillos de control del disolvente – respuesta media en los pocillos tratados con MeOH [= mortalidad del 100 %])

43. No deben incluirse en el análisis final de los datos los pocillos con una viabilidad inferior al 80 %, respecto a la viabilidad media de los controles de disolvente (= viabilidad del 100 %). Hay que evaluar cuidadosamente la inhibición de la esteroidogénesis que se dé en presencia de una citotoxicidad de casi el 20 %, para asegurarse de que la citotoxicidad no es la causa de la inhibición.

Análisis hormonal

44. Cada laboratorio puede utilizar el sistema de medición hormonal que prefiera para el análisis de la T y del E2. Las alícuotas de medio de reserva de cada grupo de tratamiento pueden utilizarse para preparar diluciones a fin de llevar la concentración a la porción lineal de la curva patrón. Como se indica en el punto 29, cada laboratorio debe demostrar la conformidad de su sistema de medición hormonal (por ejemplo, ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) con los criterios de control de calidad analizando medio suplementado al que se ha añadido un patrón interno de hormona antes de efectuar las tandas de control de calidad o de llevar a cabo el ensayo de las sustancias problema. A fin de garantizar que los componentes del sistema de ensayo no interfieren con la medición de las hormonas, es posible que se tengan que extraer estas de los medios antes de medirlas (véase el punto 30 sobre las condiciones que hacen necesaria la extracción de las hormonas). Se recomienda llevar a cabo la extracción siguiendo los procedimientos del apéndice III del informe de validación (4).
45. Si se utiliza un equipo de ensayo comercial para medir la producción de hormonas, el análisis de estas debe realizarse según lo especificado en los manuales proporcionados por el fabricante del equipo de ensayo. La mayoría de los fabricantes tienen un procedimiento original para efectuar dichos análisis. Las diluciones de las muestras deben ajustarse de manera que las concentraciones hormonales previstas para los controles de disolvente caigan en el centro del intervalo lineal de la curva patrón del ensayo concreto de que se trate [apéndice III del informe de validación (4)]. Deben rechazarse los valores que queden fuera de la porción lineal de la curva patrón.
46. Las concentraciones hormonales finales se calcularán de la manera siguiente:

Ejemplo:

Extracción:	450 µl de medio
Reconstitución en:	250 µl de amortiguador del ensayo
Dilución en el ensayo:	1:10 (para llevar la muestra al intervalo lineal de la curva patrón)
Concentración hormonal en el ensayo:	150 pg/ml (ya ajustada a la concentración por ml de muestra analizada)
Recuperación:	89 %
Concentración hormonal final =	(concentración hormonal (por ml) ÷ recuperación) (factor de dilución)
Concentración hormonal final =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Selección de las concentraciones de ensayo

47. Debe llevarse a cabo un mínimo de dos tandas independientes del ensayo. Salvo que se disponga de información anterior, por ejemplo sobre los límites de solubilidad o sobre la citotoxicidad, que permita seleccionar las concentraciones de ensayo, se recomienda que las concentraciones de la sustancia problema en la tanda inicial estén separadas por intervalos logarítmicos, siendo 10^{-3} M la concentración máxima. Si la sustancia es soluble, y no es

citotóxica a ninguna de las concentraciones ensayadas, y la primera tanda ha sido negativa para todas las concentraciones, hay que confirmar entonces con otra tanda aplicando las mismas condiciones que en la primera (cuadro 7). Si los resultados de la primera tanda son *dudosos* (es decir, si el factor multiplicador del cambio es estadísticamente significativo respecto al control de disolvente solo a una concentración) o *positivos* (es decir, el factor multiplicador del cambio es estadísticamente significativo a dos o más concentraciones adyacentes), debe repetirse el ensayo tal como se indica en el cuadro 7, afinando las concentraciones de ensayo seleccionadas. Las concentraciones de ensayo de las tandas dos y tres (en su caso) deben ajustarse en función de los resultados de las concentraciones extremas de la tanda inicial que hayan provocado efectos utilizando un intervalo semilogarítmico entre concentraciones (por ejemplo, si con la serie original de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM se han inducido efectos a 1 y 10 μM , las concentraciones usadas en la segunda tanda deberán ser 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), salvo que haya que emplear concentraciones inferiores para conseguir una LOEC. En este último caso, deben utilizarse en la segunda tanda por lo menos cinco concentraciones por debajo de la menor concentración estudiada en la primera tanda, aplicando una escala semilogarítmica. Si esta segunda tanda no confirma los resultados de la primera (es decir, no se encuentra significación estadística a la concentración de ensayo que anteriormente ha dado resultado positivo, con un incremento de concentración de ± 1), se realizará un tercer ensayo utilizando las condiciones de ensayo originales. Los resultados *dudosos* de la primera tanda se consideran *negativos* si el efecto observado no puede confirmarse en ninguna de las dos tandas siguientes. Los resultados *dudosos* se consideran *positivos* (hay efecto) si la respuesta puede confirmarse en al menos una tanda más con un incremento de concentración de ± 1 (véase en el punto 55 el procedimiento de interpretación de los datos).

Cuadro 7

Matriz de decisiones según las situaciones posibles

Tanda 1	Tanda 2		Tanda 3		Decisión	
Situación	Decisión	Situación	Decisión	Situación	Positiva	Negativa
Negativa	Confirmar ^(a)	Negativa	Parar			X
Negativa	Confirmar ^(a)	Positiva	Afinar ^(b)	Negativa		X
Dudosa ^(c)	Afinar ^(b)	Negativa	Confirmar ^(a)	Negativa		X
Dudosa ^(c)	Afinar ^(b)	Negativa	Confirmar ^(a)	Positiva	X	
Dudosa ^(c)	Afinar ^(b)	Positiva			X	
Positiva	Afinar ^(b)	Negativa	Confirmar ^(a)	Positiva	X	
Negativa	Confirmar ^(a)	Positiva	Afinar ^(b)	Positiva	X	
Positiva	Afinar ^(b)	Positiva	Parar		X	

^(a) Confirmar la tanda anterior con el mismo diseño experimental.

^(b) Hacer otra tanda con intervalos semilogarítmicos de concentración, englobando la concentración que había dado resultados significativamente diferentes en el experimento anterior.

^(c) El factor multiplicador del cambio es estadísticamente diferente de forma significativa respecto al resultado del CD a una sola concentración.

Control de calidad de la placa de ensayo

48. Además de los criterios de la placa de control de calidad, deben cumplirse otros criterios de calidad (indicados en el cuadro 8) que se refieren a la variación aceptable entre pocillos replicados, experimentos replicados, la linealidad y la sensibilidad de los sistemas de medición de hormonas, la variabilidad entre mediciones replicadas de hormonas de la misma muestra, y el porcentaje de recuperación de las hormonas añadidas, tras la extracción del medio (en su caso, véase el punto 30 en cuanto a los requisitos de la extracción). Para ser considerados en una evaluación posterior, los datos deben quedar dentro de los intervalos aceptables definidos para cada parámetro. Si dichos criterios no se cumplen, la hoja de cálculo debe recoger que la muestra en cuestión no cumplía los criterios de control de calidad, y la muestra debe volver a analizarse o bien se elimina del conjunto de datos.

Cuadro 8

Bandas y/o variaciones (%) aceptables de los parámetros de la placa de ensayo del ensayo H295R.

LDC: límite de cuantificación del sistema de medición hormonal. CV: coeficiente de variación; CD: control del disolvente; DPM: desintegraciones por minuto

	Comparación	T	E2
Producción basal de hormona en los CD	Factor multiplicador respecto al LDC	≥ 5 veces	≥ 2,5 veces
Experimentos de exposición — CV de los CD dentro de una placa (pocillos replicados)	Concentraciones absolutas	≤ 30 %	≤ 30 %
Experimentos de exposición — CV de los CD entre placas (experimentos replicados)	Factor multiplicador del cambio	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema de medición hormonal –Sensibilidad	Factor de reducción detectable respecto al CD	≥ 5 veces	≥ 2,5 veces
Sistema de medición hormonal — CV de de las medidas replicadas de los CD ^(a)	Concentraciones absolutas	≤ 25 %	≤ 25 %
Extracción del medio — Recuperación del patrón interno de ³ H (en su caso)	DPM	≥ 65 % del valor nominal	

^(a) Se refiere a las medidas replicadas de la misma muestra.

ANÁLISIS DE LOS DATOS E INFORME

Análisis de los datos

49. Para evaluar el aumento/descenso relativo de la producción hormonal alterada químicamente, los resultados deben normalizarse teniendo en cuenta el valor medio de los controles de disolvente de cada placa de ensayo, y los resultados se expresan como cambios respecto al control de disolvente de cada placa de ensayo. Todos los datos se deben expresar como media ± 1 desviación típica (DT).
50. Deben incluirse en el análisis de datos tan solo los datos hormonales de los pocillos donde la citotoxicidad haya sido inferior al 20 %. Los cambios relativos deben calcularse de la manera siguiente:

Cambio relativo = (concentración hormonal en cada pocillo) ÷ (concentración hormonal media en todos los pocillos de control del disolvente).

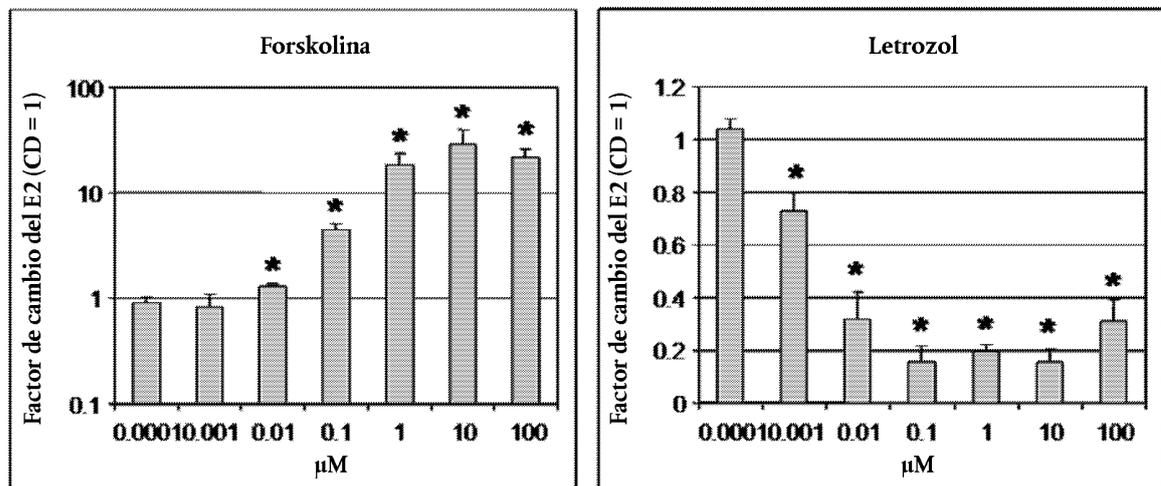
51. Si la inspección visual del pocillo o el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad descrito en el punto 42 parecen indicar un aumento del número de células, habrá que verificar dicho aumento aparente. Si se confirma el aumento del número de células, este extremo debe reflejarse en el informe del ensayo.
52. Antes de llevar a cabo análisis estadísticos, deben evaluarse las hipótesis de normalidad y de homogeneidad de la varianza. La normalidad debe evaluarse utilizando gráficos de probabilidad normal u otro método estadístico apropiado (por ejemplo, la prueba de Shapiro-Wilk). Si los datos (factor multiplicador del cambio) no se distribuyen normalmente, debe intentarse su transformación para aproximarlos a una distribución normal. Si los datos se distribuyen normalmente o se aproximan a una distribución normal, las diferencias entre los grupos a los que se han administrado las concentraciones de sustancia problema y los grupos de control del disolvente deben analizarse mediante una prueba paramétrica (por ejemplo, la prueba de Dunnett) tomando la *concentración* como variable independiente y la *respuesta* (factor multiplicador del cambio) como dependiente. Si los datos no se distribuyen normalmente, debe utilizarse una prueba no paramétrica adecuada (por ejemplo, la prueba de Kruskal Wallis, la prueba de rango de muchos a uno de Steel). Las diferencias se consideran significativas a $p \leq 0,05$. Las evaluaciones estadísticas se hacen sobre la base de los valores medios de cada pocillo, que representan puntos de datos replicados independientes. Se prevé que, debido al amplio espaciado entre las dosis en la primera tanda (escala logarítmica), en muchos casos no será posible describir una relación clara entre concentración y respuesta cuando las dos dosis mayores se encuentren en la porción lineal de la curva sigmoidea. Por lo tanto, para la primera tanda o para cualquier otro conjunto de datos en los que se dé esta condición (por ejemplo, en los casos en que no pueda estimarse una eficacia máxima) se aplicará un análisis estadístico de variable fijada de tipo I, tal y como se describe anteriormente.

53. Si hay más de dos puntos de datos en la porción lineal de la curva y si pueden calcularse las eficacias máximas (como se prevé con algunas segundas tandas que se llevan a cabo utilizando espaciados semilogarítmicos entre las concentraciones de exposición), deben utilizarse cálculos con probit, logit u otros modelos adecuados de regresión para calcular las concentraciones eficaces (por ejemplo, CE50 y CE20).
54. Los resultados se deben dar en forma de gráficos (gráficos de barras que representen la media \pm 1 DT) y de cuadros (LOEC/NOEC, dirección del efecto, y magnitud de la respuesta máxima que forma parte de la banda de dosis-respuesta de los datos) (en la figura 3 se ofrece un ejemplo). La evaluación de los datos se considera válida solo si se basa al menos en dos tandas llevadas a cabo de forma independiente. Un experimento o tanda se considera independiente si se ha llevado a cabo en una fecha diferente, utilizando un nuevo conjunto de soluciones y de controles. El intervalo de concentraciones utilizadas en las tandas 2 y 3 (en su caso) puede adaptarse sobre la base de los resultados de la tanda 1 para definir mejor la banda de dosis-respuesta que contiene el LOEC (véase el punto 47).

Figura 3

Ejemplo de presentación y evaluación de los datos obtenidos durante la realización del ensayo H295R en forma de gráfico y de cuadro.

Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de disolvente ($p < 0,05$). LOEC: concentración mínima con efecto observado; Factor multiplicador máximo del cambio: magnitud máxima de la respuesta observada a cualquier concentración respecto a la respuesta media del control de disolvente (= 1)



Sustancia	LOEC	Factor multiplicador máximo del cambio
Forskolina	0,01	29 veces
Letrozol	0,001	0,15 veces

Procedimiento de interpretación de los datos

55. Se considera que una sustancia problema es positiva si el factor multiplicador de la inducción es estadísticamente diferente ($p \leq 0,05$) respecto al control del disolvente a dos concentraciones adyacentes en al menos dos tandas independientes (cuadro 7). La sustancia problema se considera negativa a raíz de dos tandas negativas independientes, o de tres tandas cuando dos de ellas son negativas y una es dudosa o positiva. Si los datos generados en tres experimentos independientes no cumplen los criterios de decisión que figuran en el cuadro 7, no es posible interpretar los resultados experimentales. Los resultados correspondientes a concentraciones que superen los límites de solubilidad o a concentraciones citotóxicas no deben incluirse en la interpretación de los resultados.

Informe del ensayo

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

Instalación de ensayo

- Nombre de la instalación y ubicación;
- Director y demás personal del estudio, con sus responsabilidades en el mismo;
- Fechas de inicio y final del estudio;

Sustancia problema, reactivos y controles

- Identidad (nombre/nº CAS, según proceda), origen, número de lote, pureza, proveedor y caracterización de la sustancia problema, de los reactivos y de los controles;
- Naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes de la sustancia problema;
- Condiciones de almacenamiento y método y frecuencia de la preparación de las sustancias problema, de los reactivos y de los controles;
- Estabilidad de la sustancia problema;

Células

- Fuente y tipo de células;
- Número de pases (código de pases) de las células utilizadas en el ensayo;
- Descripción de los procedimientos de mantenimiento de los cultivos celulares;

Requisitos previos al ensayo, en su caso

- Descripción y resultados de la prueba de interferencia del sistema de medición hormonal con la sustancia problema;
- Descripción y resultados de las mediciones de la eficacia de la extracción hormonal;
- Curvas patrón y de calibración de todos los ensayos analíticos que se van a realizar;
- Límites de detección correspondientes a los ensayos analíticos seleccionados;

Condiciones del ensayo

- Composición de los medios;
- Concentración de la sustancia problema;
- Densidad celular (concentraciones celulares estimadas o medidas a las 24 y a las 48 horas);
- Solubilidad de la sustancia problema (límite de solubilidad, si se ha determinado);
- Tiempo y condiciones de incubación;

Resultados del ensayo

- Datos en bruto de cada pocillo de los controles y de las sustancias problema-cada medida replicada, en la forma de los datos originales proporcionados por el instrumento utilizado para medir la producción hormonal (por ejemplo, DO, unidades de fluorescencia, DPM, etc.);
- Validación de la normalidad o explicación de la transformación de los datos;
- Respuestas medias \pm 1 desviación típica de cada pocillo medido;
- Datos de citotoxicidad (concentraciones de ensayo que han causado citotoxicidad);
- Confirmación de que se han cumplido los requisitos en materia de control de calidad (CC);
- Cambio relativo en comparación con el control de disolvente corregido para tener en cuenta la citotoxicidad;
- Gráfico de barras que indique el cambio relativo (factor multiplicador del cambio) en cada concentración, la desviación típica y la significación estadística según se describe en los puntos 49-54;

Interpretación de los datos

- Aplicación del procedimiento de interpretación de los datos a los resultados y discusión de las observaciones;

Discusión

- ¿Aporta indicios el estudio en lo que respecta a la posibilidad de que los datos de T/E2 puedan estar influidos por efectos indirectos sobre las vías de los gluco y mineralocorticoides?

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OCDE (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos), en el apéndice 2 del capítulo B.54 del presente anexo.
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- (4) OCDE (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OCDE (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Disponible en la dirección: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.
- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Capítulo B.55 del presente anexo, Bioensayo de Hershberger con ratas: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades (anti)androgénicas.
- (17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.

-
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
 - (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.
-

Apéndice

DEFINICIONES

Confluencia: Cobertura o proliferación que pueden tener las células en el medio de cultivo.

Sustancia: Sustancia o mezcla.

CV: Coeficiente de variación, que es la relación entre la desviación típica de una distribución y su media aritmética.

CYP: Mono-oxigenasas del citocromo P450, que son una familia de genes y de enzimas codificadas por estos, y que participan en la catálisis de una amplia variedad de reacciones bioquímicas, entre las que se incluyen la síntesis y el metabolismo de las hormonas esteroideas.

DPM: Desintegraciones por minuto. Es el número de átomos presentes en una determinada cantidad de material radiactivo cuya desintegración se detecta en un minuto.

E2: El 17 β -estradiol, que es el estrógeno más importante de los mamíferos.

Células H295R: Células de adenocarcinoma humano que tienen las características fisiológicas de las células suprarrenales sin diferenciación zonal de los fetos humanos y que expresan todas las enzimas de la vía de la esteroidogénesis. Pueden conseguirse de la ATCC.

Medio de congelación: Se utiliza para congelar las células y mantenerlas congeladas. Consiste en el medio de partida al que se ha añadido BD NuSerum y dimetil-sulfóxido.

Intervalo lineal: Rango dentro de la curva patrón de un sistema de medición hormonal en el que los resultados son proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra.

LDC: Significa "límite de cuantificación" y es la cantidad más pequeña de una sustancia cuya presencia puede distinguirse de su ausencia (valor en blanco), dentro de un límite de confianza establecido. A los efectos de este método, el LDC suele estar definido por el fabricante de los sistemas de ensayo, si no se especifica lo contrario.

LOEC: Concentración mínima con efecto observado, que es la concentración más baja a la cual la respuesta del ensayo es estadísticamente diferente de la del control del disolvente.

NOEC: Concentración sin efecto observado, que es la mayor concentración estudiada si el ensayo no proporciona respuesta positiva.

Pase: Número de veces que se resiembran las células después de la iniciación de un cultivo a partir de un material congelado. Al primer pase que procede del material congelado se le asigna el número 1. Las células que se resiembran una vez se etiquetan como de pase 2, etc.

PBS: Solución salina amortiguadora de fosfato de Dulbecco.

Control de calidad (abreviado a CC): Medidas necesarias para garantizar la obtención de datos válidos.

Placa de control de calidad: Placa de 24 pocillos que contiene dos concentraciones de los controles positivos y negativos para supervisar el comportamiento de un lote nuevo de células o aportar los controles positivos del ensayo cuando se estudian sustancias problema.

Tanda: Experimento independiente que se caracteriza por un nuevo conjunto de soluciones y de controles.

Medio de partida: Base para la preparación de los demás reactivos. Consiste en una mezcla 1:1 del medio de Eagle modificado por Dulbecco y de mezcla nutritiva F-12 de Ham (DMEM/F12) en solución amortiguadora HEPES 15 mM sin rojo de fenol ni bicarbonato de sodio. El bicarbonato de sodio se añade como amortiguador, véase el apéndice II del informe de validación (4).

Medio suplementado: Medio de partida más BD Nu-Serum e ITS+ premium mix; véase el apéndice II del informe de validación (4).

Esteroidogénesis: Vía de síntesis que lleva del colesterol a las distintas hormonas esteroideas. Varios intermedios de la síntesis esteroidea, como la progesterona y la testosterona, son importantes hormonas por sí mismas, pero también sirven de precursores de otras hormonas que se sintetizan más adelante en la vía.

T: Testosterona, uno de los dos más importantes andrógenos de los mamíferos.

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

Placa de ensayo: Placa en la que las células H295R se exponen a las sustancias problema. Las placas de ensayo contienen el control del disolvente y la sustancia problema a siete niveles de concentración por triplicado.

Tripsina IX: Solución diluida de la enzima tripsina, que es una serina-proteasa pancreática, utilizada para liberar las células de una placa de cultivo celular; véase el apéndice III del informe de validación (4).

B.58. ENSAYOS DE MUTACIÓN GÉNICA EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y REPRODUCTORAS DE ROEDORES TRANSGÉNICOS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 488 (2013). Hay métodos de ensayo de la UE para una amplia gama de ensayos de mutación *in vitro* que permiten detectar mutaciones génicas o cromosómicas. Se dispone de métodos de ensayo para algunos parámetros *in vivo* (es decir, aberraciones cromosómicas y síntesis de ADN no programada); sin embargo, estos no miden las mutaciones génicas. Los ensayos de mutación en roedores transgénicos (RTG) satisfacen la demanda de ensayos *in vivo* de mutaciones génicas que sean prácticos y estén ampliamente disponibles.
2. Los ensayos de mutación en RTG han sido objeto de una extensa revisión (24)(33). Utilizan ratas y ratones transgénicos que contienen múltiples copias de vectores lanzadera de plásmidos o de bacteriófagos, integradas en los cromosomas. Los transgenes contienen genes marcadores para la detección de diversos tipos de mutaciones inducidas *in vivo* por las sustancias problema.
3. Las mutaciones que se producen en los roedores se detectan a través de la recuperación del transgén y del análisis del fenotipo del gen marcador en un hospedador bacteriano que carece de dicho gen marcador. Los ensayos de mutación génica en RTG miden las mutaciones inducidas en genes genéticamente neutros recuperados de prácticamente cualquier tejido de los roedores. Estos estudios, por tanto, soslayan muchas de las actuales limitaciones relativas al estudio de las mutaciones génicas *in vivo* en genes endógenos (por ejemplo, la gama limitada de tejidos adecuados para el análisis, la selección positiva/negativa frente a las mutaciones).
4. La ponderación de las pruebas sugiere que los transgenes responden a los mutágenos de manera similar a la de los genes endógenos, especialmente por lo que se refiere a la detección de sustituciones de un par de bases, desplazamiento del marco de lectura, y pequeñas deleciones e inserciones (24).
5. Los talleres internacionales sobre ensayos de genotoxicidad (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) han refrendado la inclusión de los ensayos de mutación génica en RTG para la detección *in vivo* de mutaciones génicas, y han recomendado un protocolo para su aplicación (15)(29). El presente método se basa en estas recomendaciones. En apoyo del presente protocolo se pueden encontrar más análisis en (16).
6. Se prevé que en el futuro se pueda combinar un ensayo de mutación génica en RTG con un estudio de toxicidad por administración continuada (método de ensayo B. 7 del presente anexo). Sin embargo, hacen falta datos para garantizar que la sensibilidad de los ensayos de mutación génica en RTG no se ve afectada por la diferencia del plazo entre el final del período de administración y el momento del muestreo, plazo que es de un día en el estudio de toxicidad por administración continuada, más breve que el plazo de tres días utilizado en los ensayos de mutación génica en RTG. También hacen falta datos que indiquen que el comportamiento del ensayo por administración continuada no se ve afectado negativamente por utilizar una cepa de roedores transgénicos en lugar de una cepa de roedores tradicionales. Cuando se disponga de estos datos, se actualizará el presente método de ensayo.
7. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice.

CONSIDERACIONES INICIALES

8. Los ensayos de mutación génica en RTG de los que se dispone de suficientes datos para avalar su utilización en el presente método de ensayo son los siguientes: ratón con el bacteriófago *lacZ* (MutaTMMouse); ratón con el plásmido *lacZ*; ratón y rata *gpt* delta (*gpt* y *Spi*⁺); ratón y rata *lacI* (Big Blue[®]), llevados a cabo en condiciones normales. Además, el ensayo de selección positiva *cII* puede utilizarse para evaluar las mutaciones en los modelos Big Blue[®] y MutaTMMouse. La mutagénesis en los modelos de RTG se evalúa normalmente como la frecuencia de mutantes; cuando sea preciso, sin embargo, el análisis molecular de las mutaciones puede proporcionar información adicional (véase el punto 24).
9. Estos ensayos de mutación génica *in vivo* en roedores están especialmente indicados para evaluar el peligro mutagénico, ya que las respuestas de los ensayos dependen del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética, de los procesos de reparación del ADN, y de la síntesis de ADN translesión, si bien dichos factores pueden variar según la especie, según el tejido y según los tipos de lesiones del ADN. Un ensayo *in vivo* de mutación génica es útil para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*, y para el seguimiento de los resultados de ensayos que utilizan otros parámetros *in vivo* (24). Además de estar asociada como causa de la inducción del cáncer, la mutación génica es un parámetro importante para la predicción de enfermedades distintas del cáncer basadas en mutaciones en tejidos somáticos (12)(13), así como de enfermedades transmitidas por las células germinales.

10. Si hay indicios de que la sustancia problema o un metabolito relevante no va a alcanzar ninguno de los tejidos de interés, no es apropiado llevar a cabo un ensayo de mutación génica en RTG.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. En los ensayos descritos en el punto 8, el gen diana procede de una bacteria o de un bacteriófago y el medio para recuperarlo del ADN genómico del roedor es la incorporación del transgén a un vector de lanzadera de bacteriófagos λ o de plásmidos. El procedimiento implica la extracción de ADN genómico del tejido del roedor de interés, el tratamiento *in vitro* del ADN genómico (es decir, la encapsidación de los vectores λ , o la ligadura y electroporación de plásmidos para recuperar el vector de lanzadera), y la posterior detección de las mutaciones en hospedadores bacterianos en condiciones adecuadas. Los ensayos emplean transgenes neutros que son fácilmente recuperables de la mayor parte de los tejidos.
12. El experimento de mutación génica en RTG de base implica el tratamiento de los roedores con una sustancia a lo largo de un plazo. Las sustancias pueden administrarse por cualquier vía adecuada, incluida la implantación (por ejemplo, ensayos de productos sanitarios). El plazo total durante el cual se administra la sustancia a un animal se denomina período de administración. La administración suele ir seguida de un período de tiempo, antes del sacrificio de los animales, durante el cual no se administra la sustancia y en el cual se fijan las lesiones de ADN no reparadas convirtiéndose en mutaciones estables. En la bibliografía, este período recibe diversas denominaciones, como tiempo de manifestación, tiempo de fijación o tiempo de expresión; este período termina en el momento del muestreo (15)(29). Después de que se sacrifique el animal, se aísla el ADN genómico del tejido o tejidos de interés y se purifica.
13. Normalmente se agregan los datos obtenidos con un solo tejido por animal a partir de múltiples encapsidaciones/ligaduras, y la frecuencia de mutantes se evalúa en general utilizando un total de entre 10^5 y 10^7 unidades formadoras de calvas o formadoras de colonias. Cuando se utilicen métodos de selección positiva, el total de unidades formadoras de calvas se determinará con un conjunto separado de placas no selectivas.
14. Se han elaborado métodos de selección positiva para facilitar la detección de mutaciones en el gen *gpt* [ratón y rata *gpt* delta, fenotipo *gpt*⁻ (20)(22)(28)] y en el gen *lacZ* [MutaTMMouse o ratón con el plásmido *lacZ* (3)(10)(11)(30)], mientras que las mutaciones del gen *lacI* en animales Big Blue® se detectan mediante un método no selectivo que identifica las mutaciones mediante la generación de calvas de color (azul). También se dispone de una metodología de selección positiva para detectar las mutaciones puntuales que se producen en el gen *cII* del vector de lanzadera del bacteriófago λ [ratón o rata Big Blue®, y MutaTMMouse (17)] y las mutaciones de delección en los genes *red* y *gam* [selección Spi⁻ en ratón y rata *gpt* delta (21)(22)(28)]. La frecuencia de mutantes se calcula dividiendo el número de calvas/plásmidos que contienen mutaciones en el transgén por el número total de calvas/plásmidos recuperados de la misma muestra de ADN. En los estudios de mutación génica en RTG, el parámetro comunicado es la frecuencia de mutantes. Además, la frecuencia de mutación puede determinarse como la fracción de células que portan mutaciones independientes; este cálculo requiere que se apliquen correcciones para tener en cuenta la expansión clonal secuenciando los mutantes recuperados (24).
15. Las mutaciones objeto de puntuación en los ensayos de mutación puntual en *lacI*, *lacZ*, *cII* and *gpt* consisten principalmente en mutaciones de sustitución de un par de bases, en mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y en pequeñas inserciones y deleciones. La proporción relativa de estos tipos de mutación entre las mutaciones espontáneas es similar a la observada en el gen *Hprt* endógeno. Las grandes deleciones solo se detectan con los ensayos de selección de Spi⁻ y del plásmido *lacZ* (24). Las mutaciones de interés son las mutaciones *in vivo* que se producen en el ratón o en la rata. Las mutaciones *in vitro* y *ex vivo*, que pueden darse durante la recuperación, replicación o reparación de los bacteriófagos/plásmidos, son relativamente raras, y en algunos sistemas pueden identificarse específicamente, o excluirse del sistema de hospedador bacteriano/selección positiva.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Selección de la especie animal

16. Actualmente se dispone de una variedad de modelos para la detección de mutaciones génicas en ratones transgénicos, y estos sistemas ya se han utilizado más ampliamente que los modelos de ratas transgénicas. Cuando la rata sea un modelo claramente más adecuado que el ratón (por ejemplo, para investigar el mecanismo de la carcinogénesis de un tumor que solo se ha visto en ratas, para establecer una correlación con un estudio de toxicidad en ratas, o si se sabe que el metabolismo de las ratas es más representativo del metabolismo humano), debe considerarse la utilización de modelos de ratas transgénicas.

Condiciones de alojamiento y alimentación

17. Lo ideal es que el local de los animales de experimentación esté a una temperatura de 22 °C (\pm 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, debe procurarse que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. La iluminación debe ser artificial, con una secuencia diaria de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por esta vía. Los animales deben alojarse en grupos pequeños (no más de cinco animales juntos) del mismo sexo si no se espera una conducta agresiva. Los animales pueden alojarse por separado, si está justificado científicamente.

Preparación de los animales

18. Se asignan aleatoriamente a los grupos de control y de tratamiento animales sanos, adultos jóvenes, maduros sexualmente (8-12 semanas de edad al inicio del tratamiento). Los animales se identifican inequívocamente y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de \pm 20 % del peso medio de cada sexo.

Preparación de las dosis

19. Las sustancias problema sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Las sustancias problema líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En lo que respecta a la exposición por inhalación, las sustancias problema pueden administrarse en forma de gas, de vapor o de aerosol sólido o líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Han de emplearse preparaciones recientes de la sustancia problema, salvo que haya datos de estabilidad que demuestren que es posible conservarlas.

Condiciones del ensayo*Disolvente o vehículo*

20. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a los volúmenes de dosis empleados, y no debe haber ninguna sospecha de que reaccione químicamente con la sustancia problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

Controles positivos

21. Normalmente deben utilizarse animales de control positivo en paralelo. Sin embargo, en el caso de laboratorios que hayan demostrado su competencia (véase el punto 23) y utilicen estos ensayos sistemáticamente, para confirmar el éxito del método es posible incluir en cada estudio el ADN de animales de control positivo tratados anteriormente. Este ADN de experimentos anteriores debe obtenerse de la misma especie y de los mismos tejidos de interés, y estar almacenado correctamente (véase el punto 36). Cuando se utilicen controles positivos en paralelo, no es necesario administrarlos por la misma vía que la sustancia problema; sin embargo, debe tenerse la certeza de que los controles positivos inducen mutaciones en uno o varios de los tejidos de interés para la sustancia problema. Las dosis de las sustancias de control positivo deben seleccionarse de manera que generen efectos débiles o moderados que sirvan para evaluar críticamente el comportamiento y la sensibilidad del ensayo. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias de control positivo y algunos de sus tejidos diana.

Cuadro 1

Ejemplos de sustancias de control positivo y algunos de sus tejidos diana

Sustancia de control positivo y nº CAS	Nombre EINECS y nº EINECS	Características	Tejido diana de la mutación	
			Ratas	Ratones
N-etil-N-nitrosourea [Nº CAS: 759-73-9]	N-etil-N-nitrosourea [212-072-2]	Mutágeno de acción directa	Hígado, pulmón	Médula ósea, colon, epitelio del colon, intestino, hígado, pulmones, bazo, riñones, células de la granulosa del ovario, células germinales masculinas

Sustancia de control positivo y nº CAS	Nombre EINECS y nº EINECS	Características	Tejido diana de la mutación	
			Ratas	Ratones
Carbamato de etilo (uretano) [Nº CAS: 51-79-6]	Uretano [200-123-1]	Mutágeno, requiere metabolismo pero tiene solo efectos débiles		Médula ósea, parte anterior del estómago, intestino delgado, hígado, pulmones, bazo
2,4-Diaminotolueno [nº CAS 95-80-7]	4-Metil-m-fenilendiamina [202-453-1]	Mutágeno, requiere metabolismo, también positivo en el ensayo Spi ⁻	Hígado	Hígado
Benzo[e]pireno [nº CAS 50-32-8]	Benzo[def]criseno [200-028-5]	Mutágeno, requiere metabolismo	Hígado, epiplones	Médula ósea, mama, colon, parte anterior del estómago, estómago glandular, hígado, corazón, pulmones, células germinales masculinas

Controles negativos

22. Deben incluirse controles negativos en cada momento de muestreo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, pero por lo demás de la misma manera que los grupos de tratamiento. Si no se tienen datos de control, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ningún efecto perjudicial ni mutagénico, deben incluirse también en cada momento de muestreo controles sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

Verificación de la competencia del laboratorio

23. Debe establecerse la competencia en estos ensayos demostrando la capacidad de reproducir los resultados previstos a partir de los datos publicados (24) en relación con: 1) la frecuencia de mutantes con sustancias de control positivo (incluidas las respuestas débiles) como las que figuran en el cuadro 1, con no mutágenos, y con controles del vehículo; y 2) la recuperación de transgenes a partir del ADN genómico (por ejemplo, eficacia de la encapsidación).

Secuenciación de los mutantes

24. A efectos normativos, no es necesario secuenciar el ADN de los mutantes, en particular en caso de que se obtenga un resultado positivo o negativo claro. Sin embargo, los datos de secuenciación pueden ser útiles si se observa una elevada variación entre individuos. En estos casos, la secuenciación puede utilizarse para excluir la posibilidad de "botes" o sucesos clonales determinando la proporción de mutantes individuales de un tejido concreto. La secuenciación de unos diez mutantes por tejido y por animal debe ser suficiente para determinar simplemente si los mutantes clonales contribuyen a la frecuencia de mutantes; puede ser necesario llegar a secuenciar 25 mutantes para corregir matemáticamente la frecuencia de mutantes en cuanto a la clonalidad. También puede pensarse en realizar la secuenciación de mutantes cuando se encuentren pequeños aumentos de la frecuencia de mutantes (es decir, que esta sea muy poco superior a los valores del control sin tratar). La presencia de un efecto mutagénico puede verse reforzada si se encuentran diferencias en el espectro de mutantes entre las colonias mutantes de los animales tratados y las de los animales sin tratar (29). Asimismo, los espectros de mutación pueden ser útiles para elaborar hipótesis sobre mecanismos. Cuando la secuenciación vaya a incluirse como parte del protocolo del estudio, debe ponerse especial cuidado en el diseño de dichos estudios, en particular en lo que se refiere al número de mutantes secuenciados por muestra, para alcanzar una potencia adecuada de acuerdo con el modelo estadístico utilizado (véase el punto 43).

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

25. El número de animales de cada grupo debe determinarse previamente de forma que sea suficiente para proporcionar la potencia estadística necesaria a fin de detectar, como mínimo, una duplicación de la frecuencia de mutantes. Los grupos consistirán en un mínimo de cinco animales; no obstante, si la potencia estadística es insuficiente, debe aumentarse el número de animales en la medida necesaria. Normalmente deben utilizarse animales machos. Puede haber casos en que esté justificado utilizar solo hembras; por ejemplo, cuando se realicen pruebas de medicamentos específicos para mujeres, o cuando se investigue el metabolismo específico de la mujer. Si existen diferencias importantes entre sexos en términos de toxicidad o metabolismo, será necesario utilizar tanto machos como hembras.

Período de administración

26. Sobre la base de observaciones que demuestran que las mutaciones se acumulan con cada tratamiento, es necesario aplicar un régimen de administración continuada, con tratamientos diarios durante un período de 28 días. En general, esto se considera aceptable tanto para producir una acumulación suficiente de mutaciones debidas a mutágenos débiles, como para conseguir un tiempo de exposición adecuado que permita detectar las mutaciones en los órganos de proliferación lenta. Otros regímenes de tratamiento pueden ser apropiados para algunas evaluaciones; en tal caso, tienen que justificarse científicamente en el protocolo. Los tratamientos no deben ser más breves que el tiempo necesario para la completa inducción de todas las enzimas de metabolización pertinentes, y los tratamientos más cortos pueden requerir el uso de múltiples momentos de muestreo que sean idóneos para órganos con diferentes velocidades de proliferación. En cualquier caso, toda la información disponible (por ejemplo, sobre toxicidad general o sobre metabolismo y toxicocinética) debe utilizarse para justificar un protocolo, especialmente cuando este no se atiene a las citadas recomendaciones normales. Si bien pueden incrementar la sensibilidad, el recurrir a tratamientos de más de 8 semanas de duración debe explicarse de forma clara y justificada, ya que los tratamientos largos pueden provocar un aparente incremento de la frecuencia de mutantes debido a la expansión clonal (29).

Dosis

27. Las dosis deben basarse en los resultados de un estudio de determinación de la gama de dosis en el que se determine la toxicidad general utilizando la misma vía de exposición, o bien en los resultados de estudios anteriores de toxicidad subaguda. Para la determinación de la gama de dosis pueden utilizarse animales no transgénicos de la misma cepa de roedores. En el ensayo principal, a fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, para que el estudio sea completo debe incluir un grupo de control negativo (véase el punto 22) y un mínimo de tres dosis debidamente espaciadas, excepto en caso de que se haya utilizado la dosis límite (véase el punto 28). La dosis superior debe representar la dosis máxima tolerada (DMT). Esta DMT se define como la dosis que produce signos de toxicidad tales que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo de administración, resultaría probablemente letal. Las sustancias que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y las sustancias que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones para los criterios de determinación de las dosis y deben evaluarse caso por caso. La gama de dosis utilizada deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula.

Prueba límite

28. Si los experimentos destinados a determinar la gama de dosis, o los datos existentes procedentes de cepas relacionadas de roedores, indican que un régimen de tratamiento con, como mínimo, la dosis límite (véase más adelante) no produce efectos tóxicos observables, y si no es previsible que se produzca genotoxicidad sobre la base de los datos de sustancias estructuralmente relacionadas, entonces podrá no considerarse necesario realizar un estudio completo con tres niveles de dosis. Para un período de administración de 28 días (es decir, 28 tratamientos diarios), la dosis límite es de 1 000 mg/kg peso corporal al día. Para períodos de administración de 14 días o menos, la dosis límite es de 2 000 mg/kg peso corporal al día (las posologías que se aparten del régimen de 28 tratamientos diarios deben justificarse científicamente en el protocolo; véase el punto 26).

Administración de las dosis

29. La sustancia problema suele administrarse por vía oral forzada mediante sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada. En general, a la hora de diseñar el ensayo debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por consiguiente, puede ser aceptable, siempre que se justifique, utilizar otras vías de exposición (tales como el agua de bebida, la inyección subcutánea o intravenosa, la vía tópica, la inhalación, la administración intratraqueal, los alimentos, o la implantación). No se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía fisiológicamente pertinente para la exposición humana. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. El volumen no debe superar los 2 ml/100 g de peso corporal. El uso de volúmenes superiores a este deberá justificarse. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

Momento del muestreo

Células somáticas

30. El momento del muestreo es una variable crítica, ya que viene determinado por el período necesario para que las mutaciones queden fijadas. Este período depende de cada tejido y parece estar relacionado con la velocidad de renovación de la población celular; así, la médula ósea y el intestino responden rápidamente, mientras que

el hígado es mucho más lento. Un compromiso adecuado para la medición de la frecuencia de mutantes en tejidos que proliferan tanto deprisa como despacio es el de 28 tratamientos diarios consecutivos (como se indica en el punto 26), con la realización del muestreo tres días después del último tratamiento, aunque la frecuencia máxima de mutantes puede no manifestarse en estas condiciones en los tejidos de proliferación lenta. Si son de particular importancia los tejidos de proliferación lenta, puede ser más adecuado hacer el muestreo después, a los 28 días de haber acabado el período de administración de 28 días (16)(29). En estos casos, el momento del muestreo posterior sustituiría al muestreo a los tres días, y exigiría una justificación científica.

Células germinales

31. Los ensayos con RTG son adecuados para el estudio de la inducción de mutaciones génicas en células germinales masculinas (7)(8)(27), en las que están bien definidos el calendario y la cinética de la espermatogénesis (27). El bajo número de óvulos disponible para el análisis, incluso después de una superovulación, y el hecho de que no haya síntesis de ADN en el ovocito, impiden la determinación de mutaciones en las células germinales femeninas utilizando ensayos transgénicos (31).
32. Los momentos del muestreo para las células germinales masculinas deben seleccionarse de forma que se tomen muestras de la gama de tipos de células expuestas a lo largo de todo el desarrollo de las células germinales, y que la fase diana del muestreo haya recibido una suficiente exposición. El tiempo necesario para que las células germinales en desarrollo pasen de la fase de espermatogonios a la de esperma maduro que alcanza el conducto deferente/cola del epidídimo es de unos 49 días en el caso del ratón (36) y de unos 70 días en el de la rata (34)(35). Tras una exposición de 28 días con un plazo posterior de tres días antes de realizar el muestreo, el esperma acumulado recogido del conducto deferente/cola del epidídimo (7)(8) representa a la población de células expuestas durante aproximadamente la segunda mitad de la espermatogénesis, que incluye los períodos meiótico y postmeiótico, pero no el período de espermatogonio o célula precursora. Para tomar muestras adecuadas de células del conducto deferente/cola del epidídimo que eran espermatogonios durante el período de exposición, hace falta un muestreo adicional cuando hayan pasado al menos siete semanas (ratones) o diez semanas (ratas) desde el final del tratamiento.
33. Las células extraídas de los túbulos seminíferos después de un régimen de 28 + 3 días comprenden una población mixta enriquecida con todas las fases de las células germinales en desarrollo (7)(8). El muestreo de estas células para la detección de mutaciones génicas no proporciona una evaluación tan precisa de las fases en las que se inducen las mutaciones de las células germinales como la que puede conseguirse con el muestreo de los espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo (ya que las células germinales recogidas de los túbulos son de diversos tipos, y habrá algunas células somáticas que contaminen a esta población celular). Sin embargo, el muestreo de las células de los túbulos seminíferos además del de los espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo después de solo un régimen de muestreo de 28 + 3 días incluiría en cierta medida las células expuestas durante la mayoría de las fases del desarrollo de las células germinales, y podría ser útil para detectar ciertos mutágenos de las células germinales.

Observaciones

34. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado de salud de los animales. Al menos dos veces al día, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana y en el momento del sacrificio. El consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie el agua y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (23).

Recogida de tejidos

35. Debe definirse claramente la justificación de la recogida de tejidos. Teniendo en cuenta que es posible estudiar la inducción de mutaciones en prácticamente cualquier tejido, la selección de los tejidos que van a recogerse ha de basarse en el motivo de la realización del estudio y en los eventuales datos disponibles sobre mutagenicidad, carcinogenicidad o toxicidad de la sustancia problema. Entre los factores importantes que deben considerarse están la vía de administración (sobre la base de la probable vía o vías de exposición humana), la distribución tisular prevista y el posible mecanismo de acción. A falta de información de base, deben recogerse varios tejidos somáticos que puedan ser de interés. Estos deben ser representativos de tejidos de proliferación rápida, de los de proliferación lenta y de los del lugar de contacto. Por otra parte, deben recogerse espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo y células germinales en desarrollo de los túbulos seminíferos (como se describe en los puntos 32 y 33), y reservarse por si en el futuro es necesario hacer estudios de mutagenicidad en células germinales. Debe obtenerse el peso de los órganos y, en el caso de los órganos grandes, hay que recoger la misma zona de todos los animales.

Almacenamiento de tejidos y ADN

36. Los tejidos (o sus homogeneizados) deben conservarse a una temperatura igual o inferior a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y usarse para aislar el ADN en el plazo de cinco años. Lo ideal es que el ADN aislado, conservado en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución amortiguadora adecuada, se utilice en el plazo de un año para el análisis de las mutaciones.

Selección de tejidos para análisis de mutantes

37. La selección de tejidos debe basarse en las consideraciones siguientes: 1) la vía de administración o el lugar de primer contacto (por ejemplo, el estómago glandular si la administración es oral, el pulmón si la administración se hace por inhalación, o la piel si se utiliza la aplicación tópica); y 2) los parámetros farmacocinéticos observados en los estudios de toxicidad general, que indican la eliminación, la retención o la acumulación en los tejidos, o los órganos diana de la toxicidad. Cuando se realicen estudios de seguimiento de estudios de carcinogenicidad, deben tenerse en cuenta los tejidos diana de la carcinogenicidad. La selección de los tejidos para el análisis debe maximizar la detección de sustancias que sean mutágenos de acción directa *in vitro*, las rápidamente metabolizadas, las muy reactivas o poco absorbidas, o aquellas cuyo tejido diana esté determinado por la vía de administración (6).
38. A falta de información de base y teniendo en cuenta el lugar de contacto debido a la vía de administración, debe evaluarse la mutagenicidad en el hígado y, al menos, en un tejido que se divida rápidamente (por ejemplo, el estómago glandular o la médula ósea). En la mayoría de los casos, los requisitos anteriores pueden cumplirse analizando dos tejidos seleccionados cuidadosamente, pero en algunos casos pueden ser necesarios tres o más. Si hay razones para una preocupación específica por los efectos sobre las células germinales, incluidas las respuestas positivas en células somáticas, debe evaluarse la inducción de mutaciones en los tejidos de las células germinales.

Métodos de medición

39. Se dispone de métodos de laboratorio normales o publicados para la detección de mutantes con los modelos transgénicos recomendados: bacteriófago lambda y plásmido *lacZ* (30); ratón *lacI* (2)(18); ratón *gpt* delta (22); rata *gpt* delta (28); *cII* (17). Las eventuales modificaciones deben justificarse y documentarse adecuadamente. Pueden agregarse los datos de las diversas encapsidaciones, y utilizarse para llegar a un número adecuado de calvas o colonias. No obstante, la necesidad de un número elevado de reacciones de encapsidación para alcanzar el número adecuado de calvas puede ser un signo de la mala calidad del ADN. En estos casos, los datos deben considerarse con precaución, ya que podrían ser poco fiables. El número total óptimo de calvas o colonias por muestra de ADN se rige por la probabilidad estadística de detectar un número suficiente de mutantes con una determinada frecuencia de mutantes espontáneos. En general, hace falta un mínimo de 125 000 a 300 000 calvas si la frecuencia de mutantes espontáneos es del orden de 3×10^{-5} (15). Para el ensayo con *lacI* en animales Big Blue®, es importante demostrar que toda la gama de fenotipos de color mutante puede detectarse mediante la inclusión de controles de color adecuado en paralelo con cada siembra en placa. Los tejidos y las consiguientes muestras (elementos) deben procesarse y analizarse utilizando un diseño en bloques, de forma que se procesen juntos los elementos del grupo de control del vehículo/disolvente, los del grupo de control positivo (en caso de utilizarse) o los del ADN de control positivo (en su caso), y los de cada grupo de tratamiento.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

40. Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. La unidad experimental es el animal. El informe debe incluir el número total de unidades formadoras de calvas o de unidades formadoras de colonias, el número de mutantes, y la frecuencia de mutantes para cada tejido de cada animal. Si hay varias reacciones de encapsidación/rescate, debe indicarse el número de reacciones por muestra de ADN. Aunque hay que conservar los datos de cada una de las reacciones, solo es necesario recoger en el informe el número total de unidades formadoras de calvas o de colonias. Deben comunicarse en el informe los datos sobre toxicidad y los signos clínicos, según lo establecido en el punto 34. Deben presentarse los resultados de las eventuales secuenciaciones de cada mutante analizado, y deben indicarse los cálculos de la frecuencia de mutación resultante para cada animal y tejido.

Evaluación estadística e interpretación de los resultados

41. Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo, tales como el aumento en la frecuencia de mutantes relacionado con la dosis, o un claro aumento en la frecuencia de mutantes en un único grupo tratado con la sustancia problema, en comparación con el grupo de control del disolvente o vehículo. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con la sustancia problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta. Si bien la consideración principal corresponde a la importancia biológica de los resultados, pueden utilizarse métodos estadísticos adecuados como ayuda para evaluar los resultados del ensayo (4)(14)(15)(25)(26). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

42. Una sustancia problema cuyos resultados no se ajusten a los criterios anteriores en ningún tejido se considerará no mutagénica en este ensayo. En cuanto a la importancia biológica de un resultado negativo, debe confirmarse la exposición tisular.
43. Para los análisis de secuenciación del ADN, se dispone de una serie de enfoques estadísticos para ayudar a la interpretación de los resultados (1)(5)(9)(19).
44. Para la evaluación de la significación biológica de la respuesta puede servir de orientación considerar si los valores observados se encuentran dentro o fuera del rango del control histórico (32).

Informe del ensayo

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

Sustancia problema:

- datos de identificación y nº CAS, si se conoce;
- origen y número de lote, si está disponible;
- naturaleza física y pureza;
- propiedades fisicoquímicas importantes para la realización del estudio;
- estabilidad de la sustancia problema, si se conoce;

Disolvente o vehículo:

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

Animales de experimentación:

- especie y cepa utilizadas y justificación de la elección;
- número, edad y sexo de los animales;
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo de pesos corporales, la media y la desviación típica de cada grupo;

Condiciones del ensayo:

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

- método de sacrificio compasivo;
- procedimientos de aislamiento y conservación de los tejidos;
- métodos de aislamiento del ADN genómico de los roedores, rescate del transgén desde el ADN genómico, y transferencia del ADN transgénico a un hospedador bacteriano;
- origen y números de lote de todas las células, equipos y reactivos (cuando proceda);
- métodos de recuento de mutantes;
- métodos de análisis molecular de mutantes y su utilización para la corrección de la clonalidad o para el cálculo de las frecuencias de mutación, en su caso;

Resultados:

- estado de los animales antes y a lo largo de la prueba, incluidos los signos de toxicidad;
- peso corporal y de los órganos en el momento del sacrificio;
- respecto a cada tejido o animal, número de mutantes, número de calvas o de colonias evaluadas, frecuencia de mutantes;
- respecto a cada grupo de tejidos o de animales, número de reacciones de encapsidación por muestra de ADN, número total de mutantes, frecuencia media de mutantes, desviación típica;
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible;
- respecto a cada tejido o animal, número de mutantes independientes y frecuencia media de mutación, cuando se haya llevado a cabo el análisis molecular de las mutaciones;
- datos sobre los controles negativos en paralelo y los históricos, con las gamas, medias y desviaciones típicas;
- datos del control positivo en paralelo (o del control positivo de ADN no en paralelo);
- determinaciones analíticas, si se dispone de ellas (por ejemplo, concentraciones de ADN utilizadas para la encapsidación, datos de secuenciación del ADN);
- análisis estadísticos y métodos aplicados;

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), "Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra", *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), "A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), "Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations" *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), "Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), "Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), "Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens", *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), "Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), "Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), "Bayesian Analysis of Mutational Spectra", *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), "Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), "A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host", *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", *Mutation Res.*, **705: 96-106**.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), "Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™ Mouse Mutagenicity Assays", *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), "Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.
- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), "Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), "The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing", *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), "Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), "A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi⁻ and 6-thioguanine Selections", *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), "Spi⁻ Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), "Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- (23) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, París.
- (24) OCDE (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OCDE, París.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), "Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), "Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", *Mutation. Res.*, 388(2-3): 249-289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), "Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", *Mutation. Res.*, 598: 164-193.

- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), "Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
 - (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Mutation Res.*, 540: 141-151.
 - (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), "Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo" in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.
 - (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), "A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
 - (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - (33) OCDE (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OCDE, París.
 - (34) Clermont, Y. (1972), "Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
 - (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), "The Epididymis", in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
 - (36) Russell, L.B. (2004), "Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse", *Genetica*, 122: 25-36.
-

Apéndice

DEFINICIONES

Período de administración: Período total durante el cual se administra la sustancia problema a los animales.

Sustitución de un par de bases: Tipo de mutación que provoca la sustitución de una sola base nucleotídica del ADN por otra base nucleotídica del ADN.

Cápside: Cápsula de proteína que rodea a una partícula vírica.

Sustancia: Sustancia o mezcla.

Expansión clonal: Producción de muchas células a partir de una sola célula (mutante).

Unidad formadora de colonias: Medida del número de bacterias viables.

Concatémero: Larga biomolécula continua formada por múltiples copias idénticas unidas en serie.

Sitio cos: Segmento de doce nucleótidos de ADN monocatenario que existe a ambos extremos del genoma bicatenario del bacteriófago lambda.

Delección: Mutación en la que el genoma pierde uno o varios nucleótidos (secuenciales).

Electroporación: Aplicación de impulsos eléctricos para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares.

Gen endógeno: Gen originario del genoma.

Variación extrabinomial: Variabilidad en las estimaciones repetidas de una proporción de la población que es mayor que la que se podría esperar si la población tuviera una distribución binomial.

Mutación de desplazamiento del marco de lectura: Mutación genética causada por inserciones o deleciones de un número de nucleótidos que no es divisible exactamente por tres dentro de una secuencia de ADN que codifica para una proteína o péptido.

Inserción: Adición de uno o varios pares de bases nucleotídicas a una secuencia de ADN.

“Bote”: Gran número de mutantes obtenidos mediante la expansión clonal de una sola mutación.

Grandes deleciones: Deleciones en el ADN de más de varias kilobases (que se detectan eficazmente con los ensayos de selección de Spi⁻ y del plásmido lacZ).

Ligadura: Unión covalente de dos extremos de las moléculas de ADN mediante una ADN-ligasa.

Mitógeno: Sustancia que estimula a una célula para comenzar la división celular, provocando la mitosis (es decir, la división celular).

Gen neutro: Gen que no se ve afectado por presiones selectivas positivas ni negativas.

Encapsidación: Síntesis de partículas infecciosas de un fago a partir de una preparación de proteínas de la cápside y de la cola del fago y de un concatémero de moléculas de ADN del fago. Se usa comúnmente para encapsidar ADN clonado en un vector lambda (separado por sitios cos) a fin de integrarlo en partículas lambda infecciosas.

Eficacia de la encapsidación: Eficacia con la que se recuperan en las bacterias hospedadoras los bacteriófagos encapsidados.

Unidad formadora de calvas: Medida del número de bacteriófagos viables.

Mutación puntual: Término general que designa a las mutaciones que solo afectan a una pequeña secuencia de ADN y que incluyen a las pequeñas inserciones, deleciones y sustituciones de un par de bases.

Selección positiva: Método que permite sobrevivir solo a los mutantes.

Gen marcador: Gen cuyo producto génico mutante se detecta fácilmente.

Momento del muestreo: Final del plazo, antes del sacrificio, durante el cual no se administra la sustancia problema y en el cual se fijan las lesiones de ADN no reparadas convirtiéndose en mutaciones estables.

Vector de lanzadera: Vector construido de manera que pueda propagarse en dos especies hospedadoras diferentes; en consecuencia, el ADN insertado en un vector de lanzadera puede ser objeto de examen o de manipulación en dos tipos de células diferentes o en dos organismos diferentes.

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

Transgénico: Relativo a un organismo cuyo genoma ha sido alterado por la transferencia de uno o varios genes de otra especie.»
