ISSN 1977-0685

Diario Oficial de la Unión Europea

L 193



Edición en lengua española

Legislación

55° año

20 de julio de 2012

Sumario

II *Actos no legislativos*

REGLAMENTOS

★ **Reglamento (UE) nº 640/2012 de la Comisión, de 6 de julio de 2012, 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)** [1] 1

Precio: 4 EUR

[1] Texto pertinente a efectos del EEE

ES

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres finos son actos de gestión corriente, adoptados en el marco de la política agraria, y que tienen generalmente un período de validez limitado.

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres gruesos y precedidos de un asterisco son todos los demás actos.

II

(Actos no legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) Nº 640/2012 DE LA COMISIÓN

de 6 de julio de 2012

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 3,

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 para incluir con carácter prioritario métodos alternativos de ensayo nuevos y actualizados, adoptados recientemente por la OCDE, a fin de reducir el número de animales utilizados en los experimentos, de acuerdo con 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 [3], y con la Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos [4]. Se ha consultado a los interesados sobre el presente proyecto.

(3) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) nº 440/2008 en consecuencia.

(4) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité establecido en virtud del artículo 133 del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CE) nº 440/2008 queda modificado con arreglo al 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*.

[1] DO L 396 de 30.12.2006, p. 1.
[2] DO L 142 de 31.5.2008, p. 1.
[3] DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.
[4] DO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

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

Hecho en Bruselas, el 6 de julio de 2012.

Por la Comisión
El Presidente
José MANUEL BARROSO

ANEXO

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

1) El capítulo B.42 se sustituye por el texto siguiente:

«**B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES**

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE basados en ellas se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Ya se ha adoptado el método de ensayo (ME) original para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). El LLNA actualizado se basa en la evaluación de la experiencia y de los datos científicos (12). Este es el segundo ME que se diseña para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. El otro ME (es decir, el correspondiente a la TG 406 de la OCDE, capítulo B.6 del presente anexo) utiliza ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). El LLNA resulta más ventajoso que el método B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto al bienestar de los animales. El presente ME LLNA actualizado incluye un conjunto de normas de comportamiento (NC) (apéndice 1) que puede utilizarse para evaluar la situación de la validación de métodos de ensayo nuevos o modificados que sean similares, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA, de acuerdo con los principios del documento de orientación nº 34 de la OCDE (14).

2. El LLNA estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Ha de señalarse que los sensibilizantes suaves o moderados que se recomiendan como productos químicos adecuados para el control positivo (CP) en métodos de ensayo con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), son también apropiados para utilizarse en el LLNA (6) (8) (15). En este ME se describe también la opción de un LLNA reducido (rLLNA), que podría suponer una reducción de hasta el 40 % del número de animales utilizados (16) (17) (18). El rLLNA puede utilizarse cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. La predicción de un resultado negativo debe efectuarse sobre la base de toda la información disponible según se describe en el punto 4. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si, contra lo esperado, se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación. El rLLNA no debe utilizarse para identificar el peligro de sustancias problema que sean sensibilizantes cutáneos cuando se necesite información sobre la relación dosis-respuesta, tal como la subcategorización a efectos del Reglamento (CE) nº 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y del Sistema Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos.

DEFINICIONES

3. En el apéndice 2 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA constituye un método alternativo para identificar productos químicos que pueden ser sensibilizantes cutáneos. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA en lugar de los ensayos con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), sino que, como su valor es equivalente, el LLNA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior. 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 química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA es apropiado para cada sustancia problema (dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA; véase el punto 5) y de ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. No obstante, puede reducir el número de animales necesarios para este fin. Además supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto. El LLNA se basa en la consideración de fenómenos inmunológicos desencadenados por sustancias químicas durante la fase de inducción de la sensibilización. Al contrario que los ensayos que utilizan cobayas (es decir, los del capítulo B.6, TG 406 de la OCDE) (13), el LLNA no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (13). Por consiguiente, el LLNA reduce el dolor y las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone con respecto al ensayo del capítulo B.6 y a la TG 406 de la OCDE, ha de

reconocerse que hay ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar el capítulo B.6 o la TG 406 de la OCDE (13) (por ejemplo, los resultados falsos negativos que se producen en el LLNA con determinados metales, los falsos positivos con algunos irritantes cutáneos (como algunos productos químicos del tipo de los agentes tensioactivos) (19) (20), o la solubilidad de la sustancia problema). Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (21) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Por otra parte, según la limitada base de datos de la validación, que se refiere principalmente a formulaciones de plaguicidas, el LLNA tiene mayor probabilidad que el ensayo con cobayas de dar un resultado positivo con estos tipos de sustancias problema (22). Sin embargo, cuando se somete a ensayo una formulación, podría considerarse la inclusión de sustancias similares con resultados conocidos como sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el LLNA funciona correctamente (véase el punto 16). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El principio básico del LLNA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 3 para que se pueda justificar la clasificación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en el uso de marcado radiactivo *in vivo* para medir el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. Sin embargo, pueden emplearse otros parámetros para evaluar el número de células en proliferación, siempre que se cumplan plenamente los requisitos de las normas de comportamiento (apéndice 1).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Se utilizan hembras adultas jóvenes de las cepas CBA/Ca o CBA/J, nulíparas y que no estén preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que no existen diferencias significativas específicas de la cepa o del sexo en la respuesta del LLNA.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (23), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta

positiva en el LLNA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del índice de estimulación > 3 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un índice de estimulación > 20 sería excesivo). Los controles positivos preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v) y mercaptobenzotiazol (nº CAS 149-30-4) al 5 % en *N,N*-dimetilformamida (véase el apéndice 1, cuadro 1). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de controles positivos históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA mediante la obtención constante de resultados positivos con los controles positivos en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin CP en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con CP. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con CP periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con CP periódico aceptable y el estudio con CP periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (12).

15. Aunque el CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (24). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser también útil emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (3) y (5). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (3) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N*,*N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (19), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 35). Además, cuando se obtienen datos de cada uno de los animales, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP (12). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. Sin embargo, algunas autoridades normativas pueden considerar aceptables los datos de conjuntos de animales; en tales situaciones, los usuarios pueden elegir entre recoger datos de cada animal o de conjuntos de animales.

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación cutánea local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un aumento del espesor de la oreja ≥ 25 % cualquiera de los días de la medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación del eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) (36) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva (37).

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 µl de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Días 4 y 5:* Sin tratamiento.

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal. Se inyectan 250 µl de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) estéril que contenga 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metil-timidina (tritiada) a todos los ratones (de evaluación y de control) a través de la vena de la cola. Otra posibilidad es inyectar 250 µL de PBS estéril con 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-yododesoxiuridina y fluorodesoxiuridina 10^{-5} M a todos los ratones por la vena de la cola. Al cabo de cinco horas (5 h), se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en PBS, poniendo juntos los de cada animal (enfoque por animales individuales); la otra posibilidad consiste en extirpar los ganglios linfáticos de cada oreja y sumergirlos en PBS, poniendo juntos los procedentes de cada grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento). En la referencia (12) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

Preparación de las suspensiones celulares

26. Se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extraídos bilateralmente siguiendo el enfoque por animales individuales o, alternativamente, el de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 µm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas. Las suspensiones de CGL se lavan dos veces con un exceso de PBS y el ADN se precipita con ácido tricloroacético (ATC) al 5 %, a 4 °C durante 18 h (3). A continuación el sedimento se vuelve a suspender en 1 mL de ATC y se traslada a viales de centelleo con 10 mL de líquido de centelleo para el recuento de ^{3}H, o se transfiere directamente a tubos de recuento γ para el recuento de ^{125}I.

Determinación de la proliferación celular (radiactividad incorporada)

27. La incorporación de ^{3}H-metil-timidina se mide con el contador de centelleo β, que cuenta las desintegraciones por minuto (DPM). La incorporación de ^{125}I-yododesoxiuridina se mide por el recuento de ^{125}I y también se expresa en DPM. Dependiendo del enfoque utilizado, la incorporación se expresará como DPM/ratón (enfoque por animales individuales) o DPM/grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento).

LLNA reducido

28. En ciertas situaciones, cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, es posible utilizar un protocolo de LLNA reducido (rLLNA) (16) (17) (18) con menos animales, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación.

29. La reducción del número de grupos de dosis es la única diferencia entre los protocolos del LLNA y del rLLNA, por lo que este rLLNA no proporciona información sobre la relación dosis-respuesta. En consecuencia, no debe utilizarse el rLLNA cuando se necesite obtener información sobre dicha relación. Como en el LLNA de dosis múltiples, la máxima concentración de la sustancia problema evaluada en el rLLNA debe ser la concentración máxima que no induzca en el ratón toxicidad sistémica manifiesta ni excesiva irritación cutánea local (véase el punto 18).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

30. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (37).

Pesos corporales

31. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

32. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE. Si se emplea el enfoque por animales individuales, el IE se obtiene dividiendo la media de los valores de DPM de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de DPM de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, el IE se obtiene dividiendo la incorporación de radiactividad del conjunto de cada grupo de tratamiento por la incorporación de radiactividad del conjunto del grupo de CV; así se obtiene un IE medio.

33. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 3. Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y de CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso se declara positivo (4) (5) (6).

34. Si fuera necesario aclarar los resultados obtenidos, se tendrán en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea local en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (7).

35. La recogida de datos de radiactividad de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos en cuanto a la presencia y el grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos de CV paralelos). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados "valores atípicos").

DATOS E INFORME

Datos

36. Se resumirán los datos en forma de cuadro. Si se emplea el enfoque por animales individuales, deben indicarse los valores de DPM de cada animal, la media de DPM/animal del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo de CV en paralelo. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, ha de indicarse la media o la mediana del valor de DPM, y la media del IE de cada grupo de tratamiento, comparado con el grupo de CV en paralelo.

Informe del ensayo

37. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores de DPM y del IE de cada ratón (enfoque por animales individuales) o medios (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento), correspondientes a cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de DPM/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos tratados con la sustancia problema como en los de control, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OCDE (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) Comité Científico Consultivo del CEVMA (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Comisión Europea, Dirección General Centro Común de Investigación, Instituto de Sanidad y Protección de los Consumidores, Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, april 2007. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Disponible en la dirección: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radiactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) 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, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

Apéndice 1

Normas de comportamiento para la evaluación de métodos de ensayo LLNA similares o modificados que se propongan para determinar la sensibilización cutánea

INTRODUCCIÓN

1. El objetivo de las normas de comportamiento (NC) consiste en comunicar la base por la que puede determinarse si un nuevo método de ensayo, tanto protegido (es decir, sujeto a derechos de autor, patentado, registrado) como no protegido, presenta la suficiente exactitud y fiabilidad para determinados fines de ensayo. Estas normas de comportamiento, basadas en métodos de ensayo validados y aceptados, pueden utilizarse para evaluar la fiabilidad y la exactitud de otros métodos similares (conocidos como ensayos "de imitación") que se basan en principios científicos similares y miden o predicen el mismo efecto biológico o tóxico (14).

2. Antes de la adopción de métodos modificados (es decir, posibles mejoras propuestas para un método de ensayo aprobado), debe efectuarse una evaluación para determinar el efecto que tienen los cambios propuestos sobre el comportamiento del ensayo y el grado en que tales cambios afectan a la información disponible para los demás componentes del proceso de validación. En función del número y de la naturaleza de los cambios propuestos, de los datos generados y de la documentación justificativa de tales cambios, estos métodos deben someterse o bien al mismo proceso de validación descrito para un nuevo ensayo o bien, si procede, a una evaluación limitada de la fiabilidad y de la pertinencia utilizando normas de comportamiento establecidas (14).

3. Los métodos similares o modificados cuyo uso se proponga con arreglo al presente método de ensayo deben evaluarse para determinar su fiabilidad y exactitud utilizando sustancias representativas de toda la gama de resultados del LLNA. Para evitar el uso injustificado de animales, se recomienda insistentemente que los diseñadores de modelos consulten con las autoridades competentes antes de iniciar los estudios de validación de acuerdo con las normas de comportamiento y las orientaciones recogidas en el presente método de ensayo.

4. Estas normas de comportamiento se basan en las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12), para evaluar la validez de versiones similares o modificadas del LLNA. Las normas de comportamiento consisten en componentes fundamentales del método de ensayo, sustancias de referencia recomendadas y niveles de exactitud y fiabilidad que el método propuesto debe cumplir o superar.

I. **Componentes fundamentales del método de ensayo**

5. Para garantizar que un método de LLNA similar o modificado es análogo, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA y mide el mismo efecto biológico, deben incluirse en el protocolo del método de ensayo los siguientes componentes:

— la sustancia problema debe aplicarse tópicamente en ambas orejas del ratón,

— la proliferación de linfocitos debe medirse en los ganglios linfáticos que drenan la zona donde se aplica la sustancia problema,

— la proliferación de linfocitos debe medirse durante la fase de inducción de la sensibilización cutánea,

— respecto a las sustancias problema, la dosis más alta seleccionada debe ser la concentración máxima que no induzca toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón. Respecto a las sustancias de referencia positivas, la dosis más alta debe ser al menos tan elevada como los valores de CE3 de las correspondientes sustancias de referencia del LLNA (véase el cuadro 1) sin producir toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón,

— en cada estudio debe incluirse un CV en paralelo y, cuando sea pertinente, también un CP en paralelo,

— debe utilizarse un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis,

— pueden recogerse datos de cada animal o bien de conjuntos de animales.

Si no se cumple alguno de estos criterios, no pueden utilizarse estas normas de comportamiento para la validación del método similar o modificado.

II. **Lista mínima de sustancias de referencia**

6. Las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12) señalan 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse y otras cuatro optativas [es decir, sustancias que producen resultados falsos positivos o falsos negativos en el LLNA, cuando se comparan con los resultados obtenidos con seres humanos y cobayas (el B.6, o la TG 406 de la OCDE) (13), por lo que brindan la oportunidad de demostrar un comportamiento igual o mejor que el del LLNA] que están incluidas en las normas de comportamiento del LLNA. Los criterios de selección para escoger estas sustancias son los siguientes:

— la lista de sustancias de referencia representa los tipos de sustancias que se someten normalmente a ensayo para determinar el potencial de sensibilización cutánea y la gama de respuestas que el LLNA es capaz de medir o predecir,

— las sustancias tienen una estructura química bien definida,

— respecto a cada sustancia se dispone de datos de apoyo para el LLNA procedentes de ensayos con cobayas (es decir, el capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE) (13) y, en la medida de lo posible, de datos obtenidos con seres humanos,

— las sustancias pueden conseguirse fácilmente a través de un proveedor comercial.

En el cuadro 1 se recogen las sustancias de referencia recomendadas, que deben evaluarse en el vehículo con el que figuran en el cuadro 1. En caso de que no se disponga de una sustancia de la lista, pueden utilizarse otras sustancias que cumplan los criterios de selección mencionados, aportando la justificación correspondiente.

Cuadro 1

Sustancias de referencia recomendadas para las normas de comportamiento del LLNA

Número	Sustancias ([1])	Nº CAS	Forma	Veh. ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5 x – 2,0 x CE3	Rango real CE3	LLNA/cobayas	LLNA/seres humanos
1	5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMI) y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MI) ([5])	26172-55-4/2682-20-4	Líq.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sól.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiamina	106-50-3	Sól.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloruro de cobalto	7646-79-9	Sól.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Líq.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sól.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líq.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	AHC	101-86-0	Líq.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líq.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sól.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcohol cinámico	104-54-1	Sól.	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Sól.	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líq.	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenceno	108-90-7	Líq.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Líq.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+
16	Ácido láctico	50-21-5	Líq.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato de metilo	119-36-8	Líq.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sól.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Número	Sustancias (1)	Nº CAS	Forma	Veh. (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x – 2,0 x CE3	Rango real CE3	LLNA/cobayas	LLNA/seres humanos
Sustancias optativas para demostrar un comportamiento mejorado respecto al LLNA										
19	Laurilsulfato de sodio	151-21-3	Sól.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetacrilato de etilenglicol	97-90-5	Líq.	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líq.	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloruro de níquel	7718-54-9	Sól.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abreviaturas: AOO = Acetona: aceite de oliva (4:1, v/v); nº CAS = número del Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenceno; CE3 = concentración estimada que se considera necesaria para producir un índice de estimulación de 3; cobayas = resultado del ensayo con cobayas (es decir, el B. 6 o TG 406 de la OCDE) (13); AHC = aldehído hexilcinámico; Líq. = líquido; LLNA = resultado del ensayo con ganglios linfáticos locales de múrido (es decir, el B. 42 o TG 429 de la OCDE) (1); MEK = metil-etil-cetona; NA = no aplicable por ser el índice de estimulación < 3; NC = no calculado al haberse obtenido los datos de un solo estudio; Sól. = sólido; Veh. = vehículo del ensayo.

(*) Se supone que no es sensibilizante en seres humanos, ya que no se han encontrado resultados clínicos de la prueba del parche, no está incluido en el juego de alérgenos de la prueba del parche y tampoco se han encontrado informes de casos de sensibilización en seres humanos.
(**) No se dispone de datos de ensayos con cobayas.
(1) Las sustancias deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.
(2) Debido al posible efecto del uso de vehículos diferentes sobre el comportamiento del LLNA, debe utilizarse el vehículo recomendado para cada sustancia de referencia (24) (32).
(3) El valor medio si se dispone de más de un valor de CE3. En caso de sustancias negativas (es decir, con un índice de estimulación < 3), se proporcionará la concentración de ensayo más elevada.
(4) Número de estudios de LLNA de los que se han obtenido datos.
(5) Disponible comercialmente como Kathon CG (nº CAS 55965-84-9), que es una mezcla 3:1 de CMI y MI. Las concentraciones relativas de cada componente varían del 1,1 % al 1,25 % (CMI) y del 0,3 % al 0,45 % (MI). Los componentes inactivos son sales de magnesio (del 21,5 % al 24 %) y nitrato de cobre (del 0,15 % al 0,17 %), y el resto de la formulación consiste en agua, entre el 74 % y el 77 %. Puede adquirirse fácilmente Kathon CG a través de Sigma-Aldrich y Rohm and Haas (actualmente, Dow Chemical Corporation).

III. **Niveles definidos de fiabilidad y exactitud**

7. La exactitud de un método de LLNA similar o modificado debe ser al menos igual a la de las normas de comportamiento del LLNA cuando se evalúa con las 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. El método nuevo o modificado debe llevar a una clasificación correcta basada en una decisión de tipo "sí/no". Sin embargo, es posible que el método nuevo o modificado no clasifique correctamente todas las sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. Si, por ejemplo, queda mal clasificado uno de los sensibilizantes débiles, podría tenerse en cuenta, a efectos de demostración de la equivalencia de comportamiento, una justificación de la clasificación errónea y la aportación de datos adicionales (por ejemplo, resultados del ensayo que proporcionen clasificaciones correctas de otras sustancias con propiedades físicas, químicas y sensibilizantes similares a las de la sustancia de referencia mal clasificada). En tales circunstancias, la situación de la validación del método de ensayo LLNA nuevo o modificado podría evaluarse caso por caso.

Reproducibilidad intralaboratorios

8. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar una sustancia sensibilizante que esté bien caracterizada en el LLNA. Por tanto, las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el aldehído hexilcinámico (AHC) en ensayos repetidos. Para evaluar la fiabilidad intralaboratorios, deben obtenerse valores de concentración estimada umbral (CEu) del AHC en cuatro ocasiones distintas, con un intervalo de al menos una semana entre los ensayos. Una reproducibilidad intralaboratorios aceptable viene indicada por la capacidad del laboratorio de obtener, en cada ensayo con AHC, unos valores de CEu entre el 5 % y el 20 %, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) en el LLNA (véase el cuadro 1).

Reproducibilidad interlaboratorios

9. Para determinar la reproducibilidad interlaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar dos sustancias sensibilizantes que estén bien caracterizadas en el LLNA. Las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el AHC y el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) en ensayos realizados en diferentes laboratorios. Los valores de CEu deben obtenerse independientemente a partir de un solo estudio llevado a cabo en al menos tres laboratorios distintos. Para demostrar que la reproducibilidad interlaboratorios es aceptable, cada laboratorio debe obtener unos valores de CEu del 5 % al 20 % con el AHC y del 0,025 % al 0,1 % con el DNCB, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) y el DNCB (0,05 %), respectivamente, en el LLNA (véase el cuadro 1).

Apéndice 2

Definiciones

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de "concordancia" se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (14).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Concentración estimada umbral (CEu): Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación indicativo de una respuesta positiva.

Concentración estimada tres (CE3): Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación de tres.

Falso negativo: Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

Falso positivo: Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un método de ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (14).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (14).

Ensayo de imitación: Denominación de un método de ensayo que es estructural y funcionalmente similar a un método de ensayo de referencia, validado y aceptado. Tales métodos de ensayo serían candidatos para una validación de actualización. También se pueden denominar métodos de ensayo similares (14).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto, que es similar desde el punto de vista funcional y mecánico. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo, ii) una lista mínima de sustancias de referencia seleccionadas de entre las sustancias utilizadas para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado, y iii) los niveles similares de exactitud y fiabilidad que, sobre la base de lo obtenido con el método de ensayo validado, debe mostrar el método de ensayo propuesto cuando se evalúa con la lista mínima de sustancias de referencia (14).

Método de ensayo protegido: Método de ensayo cuyos elementos tienen la fabricación y distribución restringida por patentes, derechos de autor, marcas registradas, etc.

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Sustancias de referencia: Sustancias seleccionadas para utilizarse en el proceso de validación, cuyas respuestas en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conocen. Estas sustancias deben ser representativas de las clases de sustancias con las que esté previsto utilizar el método de ensayo, y deben representar toda la gama de respuestas que puede esperarse de las sustancias con las que pueda utilizarse, desde fuertes hasta débiles e incluso negativas. Es posible que se necesiten distintos conjuntos de sustancias de referencia para las diferentes fases del proceso de validación y para los distintos métodos de ensayo y usos de los ensayos (14).

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (14).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (14).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

Método de ensayo validado: Método de ensayo sobre el cual se han completado los estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con respecto a un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (14).»

2) El capítulo B.46 se sustituye por el texto siguiente:

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

INTRODUCCIÓN

1. La irritación cutánea se refiere a la producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos y del Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (1) (3)]. El presente método de ensayo (ME) proporciona un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse para identificar el peligro de productos químicos irritantes (sustancias y mezclas) de acuerdo con la categoría 2 del SGA de la ONU y del sistema de clasificación, etiquetado y envasado (CLP, de su nombre en inglés) de la UE (1) (2) (3). En la UE y en otras regiones que no han adoptado la categoría 3 optativa del SGA de la ONU (irritantes suaves), el presente ME puede utilizarse también para identificar productos químicos no clasificados, es decir, los "sin categoría" del SGA de la ONU y del CLP de la UE (1) (3). El presente ME puede emplearse para determinar la capacidad de irritación cutánea de los productos químicos, como un ensayo independiente de sustitución del ensayo de irritación cutánea *in vivo*, dentro de una estrategia de evaluación secuencial (punto 4 y capítulo B.4 del presente anexo).

2. La evaluación de la irritación cutánea, generalmente, ha implicado el uso de animales de laboratorio (véase la TG 404 de la OCDE, capítulo B.4 del presente anexo) (4). Respondiendo a la preocupación por el bienestar de los animales, el ME B.4 se revisó en 2004 para tener en cuenta la determinación de la corrosión o irritación cutánea aplicando una estrategia de ensayos secuenciales, utilizando métodos de ensayo validados *in vitro* o *ex vivo*, lo que evita infligir daños y sufrimiento a los animales. Se han adoptado como TG 430, 431 y 534 de la OCDE tres métodos de ensayo *in vitro* validados (5) (6) (7), y dos de ellos como capítulos B.40 y B.40 *bis* del presente anexo, para su uso en la parte correspondiente a la corrosión de la estrategia de evaluación secuencial del capítulo B.4 o de la TG 404 de la OCDE (4).

3. El presente ME se refiere al efecto sobre la salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en la epidermis humana reconstruida (EhR), que, en su diseño general (utilización de queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, como origen de las células, y de un tejido y una arquitectura celular representativos), imita bien las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las capas superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. Este ME incluye también un conjunto de normas de comportamiento (NC) (apéndice 2) para la evaluación de métodos similares y modificados, basados en la EhR, y desarrollados por el CEVMA de la Comisión Europea (8), de acuerdo con los principios del documento de orientación nº 34 de la OCDE (9).

4. Hay tres métodos validados que se adhieren al presente ME. Se han completado los estudios de prevalidación, optimización y validación de un método *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), que utiliza un modelo de EhR, disponible comercialmente como EpiSkin™ (designado como método validado de referencia – MVR). Los otros dos métodos de irritación cutánea *in vitro* con EhR, disponibles comercialmente, han mostrado resultados similares a los del MVR según una validación basada en NC (21); se trata de los métodos EpiDerm™ SIT (EPI-200) y SkinEthic™ RHE (22).

5. Antes de poder utilizar con fines normativos un método con EhR *in vitro* distinto del MVR, del EpiDerm™ SIT (EPI-200) y del SkinEthic™ RhE, es necesario determinar su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones respecto al objetivo perseguido, a fin de garantizar que puede considerarse similar al MVR, de acuerdo con los requisitos de las NC establecidas en el presente ME (apéndice 2). Por otra parte, se recomienda consultar el documento explicativo de base de la OCDE sobre los ensayos de irritación cutánea *in vitro* antes de desarrollar y validar un método de EhR *in vitro* similar o modificado y de presentarlo para su adopción reglamentaria (23).

DEFINICIONES

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

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Una limitación del ME, puesta de manifiesto en el estudio de validación (16), es que no permite la clasificación de los productos químicos en la categoría 3 optativa del SGA de la ONU (irritantes suaves) (1). Cuando se utilice como ensayo de sustitución parcial, es posible que se exija la realización de ensayos de seguimiento *in vivo*, para caracterizar plenamente el potencial de irritación cutánea (4 y capítulo B.4 del presente anexo). Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.

8. El presente ME se refiere al componente de irritación cutánea *in vitro* de la estrategia de ensayos secuenciales del ME B.4 (TG 404 de la OCDE) sobre corrosión o irritación cutánea (4). Aunque el presente ME no aporta información adecuada sobre la corrosión cutánea, ha de observarse que el ME B.40 *bis* (TG 431 de la OCDE) sobre corrosión cutánea se basa en el mismo sistema de ensayo con EhR, si bien utilizando un protocolo distinto (capítulo B.40 *bis*). El presente ME se basa en modelos de EhR que utilizan queratinocitos humanos, los cuales, por lo tanto, representan *in vitro* el órgano diana de la especie de interés. Además, cubre directamente la fase inicial de la cascada inflamatoria o mecanismo de acción (el daño celular y el daño tisular que provocan traumatismo localizado) que sucede durante la irritación *in vivo*. Durante la validación del presente ME se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos, y la base de datos empíricos del estudio de validación contaba con 58 sustancias en total (16) (18) (23). El ME es aplicable a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Cuando sea posible, deberán triturarse los sólidos para transformarlos en polvo fino antes de su aplicación; no es necesario realizar ningún otro tratamiento previo de la muestra. Aún no se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles (24). Aunque no hay que descartar que estos tipos de sustancias puedan estudiarse utilizando la tecnología de EhR, el ME actual no permite ensayar gases ni aerosoles. Ha de señalarse asimismo que los productos químicos muy coloreados pueden interferir con la medición de la viabilidad celular, lo que haría necesario utilizar controles adaptados para corregir esta interferencia (véanse los puntos 24 a 26).

9. Una sola tanda de ensayos, formada por tres réplicas del tejido, debería ser suficiente para una sustancia problema, si la clasificación es inequívoca. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de un porcentaje de viabilidad media igual al 50 ± 5 %, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. La sustancia problema se aplica tópicamente a un modelo de EhR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en las capas organizadas basal, espinosa y granulosa, y en un estrato córneo con varias capas intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos, análogas a las que se encuentran *in vivo*.

11. La irritación cutánea inducida por un producto químico, que se manifiesta como eritema y edema, es el resultado de una cascada de acontecimientos que se inicia con la penetración en el estrato córneo y el daño en las capas subyacentes de los queratinocitos. Los queratinocitos que van muriendo liberan mediadores que inician la cascada inflamatoria, la cual actúa sobre las células de la dermis, particularmente las células estrómicas y endoteliales. La dilatación y el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales son los factores que producen el eritema y el edema observados (24). Los métodos basados en la EhR miden los acontecimientos que inician la cascada.

12. La viabilidad celular de los modelos de EhR se determina por la transformación enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal azul de formazano que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (25). Las sustancias irritantes se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales definidos (es decir, ≤ 50 %, en el caso los de irritantes de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE). En función del marco normativo en que se utilicen los resultados de este ME, los productos químicos que producen viabilidades celulares por encima del nivel umbral definido, pueden considerarse no irritantes (es decir, > 50 %, "sin categoría").

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

13. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los tres métodos validados que se adhieren al presente ME, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias de referencia que se recogen en el cuadro 1. En caso de métodos similares desarrollados con arreglo al presente ME o de modificaciones de cualquiera de los tres métodos validados, antes de utilizar el método para ensayos normativos es necesario cumplir los requisitos de las normas de comportamiento descritos en el apéndice 2 del presente ME.

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

Cuadro 1

Sustancias de referencia ([1])

Sustancia	Nº CAS	Puntuación *in vivo* ([2])	Estado físico	Categoría del SGA de la ONU o del CLP de la UE
Ácido naftaleno-acético	86-87-3	0	Sólido	Sin categoría
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Sin categoría
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Sin categoría
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* ([3]) ([4])
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* ([3]) ([4])
Aldehído ciclámico	103-95-7	2,3	Líquido	Cat. 2
1-Bromohexano	111-25-1	2,7	Líquido	Cat. 2
Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Líquido	Cat. 2

([1]) Estas sustancias de referencia son un subconjunto de las sustancias de referencia utilizadas en el estudio de validación.
([2]) Puntuación *in vivo* de acuerdo con el ME B.4 y la TG 404 de la OCDE (4).
([3]) Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 del SGA de la ONU (irritante suave) (1) no se considera como categoría.
([4]) La categoría optativa 3 del SGA de la ONU no es aplicable según el sistema CLP de la UE.

PROCEDIMIENTO

15. A continuación se recoge una descripción de los componentes y procedimientos de un método con modelo de EhR para evaluar la irritación cutánea. El modelo de EHR debe reconstruirse, y puede prepararse en el propio laboratorio u obtenerse comercialmente. Existen procedimientos de trabajo normalizados disponibles para el EpiSkin™, el EpiDerm™ SIT (EPI-200) y el SkinEthic™ RhE (26) (27) (28). La realización de los ensayos debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

Componentes del método de ensayo EhR

Condiciones generales

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

Condiciones funcionales

Viabilidad

17. El ensayo utilizado para determinar la magnitud de la viabilidad es el del MTT (25). Los usuarios del modelo de EhR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el control negativo (CN). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente reducida, es decir, DO < 0,1. El diseñador o proveedor del modelo de EhR establece un rango de aceptabilidad (con un límite inferior y un límite superior) de los valores de DO de los controles negativos (en las condiciones del método de ensayo de irritación cutánea), y en el cuadro 2 se indican los rangos de aceptabilidad de los tres métodos validados. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el CN son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad) durante todo el tiempo de exposición del ensayo.

Cuadro 2

Rangos de aceptabilidad de los valores de DO de los controles negativos

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Función de barrera

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

Morfología

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

Reproducibilidad

20. Los resultados de los controles positivos (CP) y negativos (CN) del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

Control de calidad (CC)

21. El diseñador o proveedor del modelo de EhR debe velar por que cada lote utilizado de este modelo cumpla los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la *viabilidad* (punto 17), a la *función de barrera* (punto 18) y a la *morfología* (punto 19), y debe demostrar dicho cumplimiento. Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. El diseñador o proveedor del modelo de EhR (o el investigador en caso de utilización de un modelo del propio laboratorio) debe establecer un rango de aceptabilidad (con límites superior e inferior) de la CI_{50} o del TE_{50}. Para conseguir una predicción fiable de la clasificación en cuanto al efecto irritante, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con tejidos adecuados. En el cuadro 3 se dan, como ejemplo, los rangos de aceptabilidad de los tres métodos validados.

Cuadro 3

Ejemplos de criterios de control de calidad para la aprobación de un lote

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (26)	CI_{50} = 1,0 mg/ml	CI_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (tritón X-100 al 1 %) (27)	TE_{50} = 4,8 h	TE_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (tritón X-100 al 1 %) (28)	TE_{50} = 4,0 h	TE_{50} = 9,0 h

Aplicación de las sustancias problema y de control

22. En cada tanda deben utilizarse al menos tres réplicas para cada sustancia problema y cada control. En caso de sustancias líquidas, así como sólidas, debe aplicarse una cantidad de sustancia problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, un mínimo de 25 $\mu L/cm^2$ o 25 mg/cm^2. En caso de sustancias sólidas, antes de aplicarlas debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con la sustancia problema. Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. Al final del período de exposición, la sustancia problema debe retirarse cuidadosamente de la superficie de la epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o con NaCl al 0,9 %. En función de cuál de los tres métodos validados de EhR se utilice, el tiempo de exposición varía entre 15 y 60 minutos, y la temperatura de incubación entre 20 y 37 °C. Estos tiempos de exposición y temperaturas se optimizan para cada método de EhR y representan las distintas propiedades intrínsecas de los métodos; puede obtenerse información más detallada en los procedimientos de trabajo normalizados correspondientes a los métodos (26) (27) (28).

23. En cada tanda deben utilizarse controles negativos (CN) y positivos (CP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con el CN), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con el CP) de los tejidos se encuentran dentro de un rango histórico de aceptación definido. Como CP se sugiere una solución acuosa de DSS al 5 %. Como CN se sugiere agua o una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS).

Medición de la viabilidad celular

24. El elemento más importante del procedimiento de ensayo consiste en que las mediciones de la viabilidad no se realicen inmediatamente después de la exposición a las sustancias problema, sino después de un período de incubación de los tejidos lavados, en medio fresco, durante un tiempo suficiente tras el tratamiento. Este período permite tanto la recuperación de los eventuales efectos citotóxicos débiles como la aparición de efectos citotóxicos claros. En la fase de optimización del ensayo (11) (12) (13) (14) (15) se demostró que la duración óptima del período de incubación tras el tratamiento es de 42 horas.

25. El ensayo del MTT es un método cuantitativo validado que debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente ME. Es compatible con el uso de un modelo de tejido tridimensional. La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (por ejemplo, de 0,3 a 1 mg/mL) durante 3 horas. A continuación, utilizando un disolvente (por ejemplo, isopropanol, isopropanol ácido), se extrae del tejido el precipitado que se produce de formazano azul y se mide la concentración de este determinando la DO a 570 nm, con un paso de banda máximo de ± 30 nm.

26. Las propiedades ópticas de la sustancia problema o su acción química sobre el MTT pueden interferir con el ensayo y llevar a una estimación errónea de la viabilidad (debido a que la sustancia problema puede impedir o invertir la formación de color, así como provocarla). Puede ocurrir así cuando una sustancia problema determinada no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis. Si la sustancia problema actúa directamente sobre el MTT (es un reductor de este), tiene color natural o se colorea durante el tratamiento del tejido, deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir la posible interferencia de la sustancia problema con la técnica de medición de la viabilidad. En los procedimientos de trabajo normalizados correspondientes a los tres métodos validados puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (26) (27) (28).

Criterios de aceptabilidad

27. En cada método en que se utilicen lotes válidos de modelos de EhR (véase el punto 21), los tejidos tratados con el CN deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo. Los valores de DO del control no deben ser inferiores a los límites históricamente establecidos. Análogamente, los tejidos tratados con el CP, es decir, DSS en solución acuosa al 5 %, deben reflejar su capacidad de responder a una sustancia irritante en las condiciones del ME (26) (27) (28). Deben definirse unas medidas asociadas y adecuadas de la variabilidad entre las réplicas del tejido [por ejemplo, si se utilizan desviaciones típicas (DT), deben estar dentro del intervalo de tolerancia del 95 % unilateral calculado a partir de los datos históricos; en el caso del MVR, la DT es < 18 %].

Interpretación de los resultados y modelo de predicción

28. Los valores de DO obtenidos con cada sustancia problema pueden utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad respecto al CN, que se fija en el 100 %. Es necesario definir claramente y documentar, así como demostrar que son adecuados, el valor de corte del porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir las sustancias problema irritantes de las no clasificadas, y el procedimiento o procedimientos estadísticos utilizados para evaluar los resultados e identificar las sustancias irritantes. A continuación se indican los valores de corte para la predicción del efecto irritante:

— se considera que la sustancia problema es irritante para la piel de acuerdo con la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE si la viabilidad del tejido después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es inferior o igual (≤) al 50 %,

— en función del marco normativo en el que se utilicen los resultados del presente ME, la sustancia problema podrá considerarse no irritante para la piel de acuerdo con la categoría "sin categoría" del SGA de la ONU o del CLP de la UE, si la viabilidad del tejido después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es superior (>) al 50 %.

DATOS E INFORME

Datos

29. Respecto a cada tanda, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas de los tejidos (por ejemplo, los valores de DO y los de los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada sustancia problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben indicarse las medias ± desviación típica de cada tanda. Con respecto a cada sustancia estudiada, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT y las sustancias problema coloreadas.

Informe del ensayo

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

Sustancias problema y de control:

— denominación o denominaciones químicas, como nombre y número CAS, o nombre y número CE, si se conocen,

— pureza y composición de la sustancia (en porcentaje del peso),

— propiedades físicas y químicas pertinentes para la realización del estudio (por ejemplo, estado físico, estabilidad, volatilidad, pH e hidrosolubilidad, si se conocen),

— tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración),

— condiciones de almacenamiento.

Justificación del modelo de EhR y del protocolo utilizados

Condiciones del ensayo:

— sistema celular utilizado,

— información justificativa completa sobre el modelo concreto de EhR utilizado, incluido su comportamiento; debe comprender, entre otras cosas:

  i) la viabilidad,

  ii) la función de barrera,

  iii) la morfología,

  iv) la reproducibilidad y capacidad de predicción,

  v) los controles de calidad del modelo,

— particularidades del procedimiento de ensayo empleado,

— dosis utilizadas en el ensayo, duración de la exposición y del período de incubación tras el tratamiento,

— descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo,

— referencia a datos históricos del modelo; debe comprender, entre otras cosas:

i) aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a los datos históricos de los lotes,

ii) aceptabilidad de los valores de los controles positivos y negativos con referencia a las medias y rangos de los controles positivos y negativos,

— descripción de los criterios de evaluación utilizados, incluida la justificación de la selección de los valores límite del modelo de predicción,

— referencia a los datos históricos del control.

Resultados:

— cuadro con los datos individuales de las distintas sustancias problema correspondientes a cada tanda y cada medición con una muestra repetida,

— indicación de los controles utilizados para sustancias problema que son reductores directos del MTT o colorantes,

— descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

(1) Naciones Unidas (2009), Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), tercera edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_s.html]

(2) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006. DO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

(4) OCDE (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OCDE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OCDE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OCDE (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (EHR)? Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy-Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OCDE (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min-42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp. 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (DO L 225 de 21.8.2001, p. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal*in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

Apéndice 1

Definiciones

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

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

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categórico, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de "exactitud" se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todas las sustancias estudiadas que se clasifican correctamente como positivas o negativas (9).

TE_{50}*:* Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración de la sustancia marcadora a una concentración fija determinada; véase también CI_{50}.

Sistema CLP de la UE [Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas]: Aplica en la Unión Europea (UE) el sistema SGA de la ONU para la clasificación y etiquetado de los productos químicos (sustancias y mezclas) (3).

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

CI_{50}*:* Puede estimarse determinando la concentración a la que una sustancia marcadora reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI_{50}) tras un tiempo fijo de exposición; véase también TE_{50}.

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

Ensayos de imitación: Denominación de un método de ensayo que es estructural y funcionalmente similar a un método de ensayo de referencia, validado y aceptado. Tales métodos de ensayo serían candidatos para una validación de actualización. También se pueden denominar métodos de ensayo similares (9).

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

Sustancias de referencia: Sustancias seleccionadas para utilizarse en el proceso de validación, cuyas respuestas en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conocen. Estas sustancias deben ser representativas de las clases de sustancias con las que esté previsto utilizar el método de ensayo, y deben representar toda la gama de respuestas que puede esperarse de las sustancias con las que pueda utilizarse, desde fuertes hasta débiles e incluso negativas. Es posible que se necesiten distintos conjuntos de sustancias de referencia para las diferentes fases del proceso de validación y para los distintos métodos de ensayo y usos de los ensayos (9).

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

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

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

Sensibilidad: Proporción de todas las sustancias positivas o activas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categóricos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Irritación cutánea: Producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas. La irritación cutánea es una reacción no inmunogénica que se presenta localmente y aparece poco tiempo después de la estimulación (29). Su característica principal es consistir en un proceso reversible con la presencia de reacciones inflamatorias y la mayoría de los signos clínicos característicos de la irritación (eritema, edema, prurito y dolor) en relación con un proceso inflamatorio.

Especificidad: Proporción de todas las sustancias negativas o inactivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categóricos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Estrategia de ensayos secuenciales: Utilización de métodos de ensayo de manera secuencial; los métodos de ensayo seleccionados en cada nivel sucesivo se deciden sobre la base de los resultados del nivel anterior de ensayos (9).

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

Apéndice 2

Normas de comportamiento para la evaluación de métodos de epidermis humana reconstruida (EhR) similares o modificados que se propongan para determinar la irritación cutánea

INTRODUCCIÓN

1. El objetivo de las normas de comportamiento (NC) consiste en comunicar la base por la que puede determinarse si un nuevo método, tanto protegido (es decir, sujeto a derechos de autor, patentado, registrado) como no protegido, presenta la suficiente exactitud y fiabilidad para determinados fines de ensayo. Estas normas de comportamiento, basadas en métodos validados y aceptados, pueden utilizarse para evaluar la fiabilidad y la exactitud de otros métodos similares (conocidos como ensayos "de imitación") que se basan en principios científicos similares y miden o predicen el mismo efecto biológico o tóxico (9).

2. Antes de la adopción de métodos modificados (es decir, posibles mejoras propuestas para un método aprobado), debe efectuarse una evaluación para determinar el efecto que tienen los cambios propuestos sobre el comportamiento del ensayo y la medida en que tales cambios afectan a la información disponible para los demás componentes del proceso de validación. En función del número y de la naturaleza de los cambios propuestos, de los datos generados y de la documentación justificativa de tales cambios, estos métodos deben someterse o bien al mismo proceso de validación descrito para un nuevo ensayo o bien, si procede, a una evaluación limitada de la fiabilidad y de la pertinencia utilizando normas de comportamiento establecidas (9).

3. Los métodos similares o modificados respecto a cualquiera de los tres métodos validados [EpiSkin™ (método validado de referencia– MVR), EpiDerm™ SIT (EPI-200) y SkinEthic™ RHE] propuestos para utilizarse con arreglo al presente ME deben evaluarse a fin de determinar su fiabilidad y exactitud, utilizando sustancias representativas de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize. Los métodos similares o modificados propuestos, cuando se evalúan con las veinte sustancias de referencia recomendadas de las normas de comportamiento (cuadro 1), deben presentar unos valores de fiabilidad y exactitud comparables a los del MVR o mejores que estos (cuadro 2) (2) (16). Los valores de fiabilidad y exactitud que deben alcanzarse se presentan en los puntos 8 a 12 del presente apéndice. Se incluyen sustancias no clasificadas ("sin categoría" según el SGA de la ONU o el CLP de la UE) y clasificadas (categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE) (1), que representan diferentes clases químicas, de forma que la fiabilidad y la exactitud (sensibilidad, especificidad y exactitud general) del método propuesto puedan compararse con las del MVR. Antes de utilizar un método para ensayar nuevas sustancias problema, debe determinarse su fiabilidad, así como su capacidad para detectar correctamente las sustancias irritantes de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE, y, en función del marco normativo para el que se obtienen los datos, también su capacidad para detectar correctamente las sustancias "sin categoría" según el SGA de la ONU o el CLP de la UE.

4. Estas NC se basan en las NC del CEVMA de la Comisión Europea (8), actualizadas de acuerdo con los sistemas de clasificación y etiquetado SGA de la ONU y CLP de la UE (1) (3). Las NC originales se definieron tras la realización del estudio de validación (21) y se basaban en el sistema de clasificación de la UE establecido en la Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas ([1]). Debido a la adopción del sistema SGA de clasificación y etiquetado de la ONU en la UE (sistema CLP de la UE) (3), que tuvo lugar entre la finalización del estudio de validación y la elaboración del presente ME, las NC se han actualizado (8). Esta actualización consiste en cambios que se refieren principalmente: i) al conjunto de sustancias de referencia de las NC, y ii) a los valores definidos de fiabilidad y exactitud (2) (23).

NORMAS DE COMPORTAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO *IN VITRO* CON EHR PARA DETERMINAR LA IRRITACIÓN CUTÁNEA

5. Las NC comprenden los tres elementos siguientes (9):

I) Componentes fundamentales del método de ensayo;

II) Lista mínima de sustancias de referencia;

III) Valores definidos de exactitud y fiabilidad.

I) **Componentes fundamentales del método de ensayo**

6. Consisten en los elementos fundamentales de carácter estructural, funcional y de procedimiento de un método validado que deben incluirse en el protocolo de un método propuesto modificado o similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Estos componentes incluyen características únicas del método, aspectos críticos del procedimiento y medidas de control de calidad. El mantenimiento de los componentes fundamentales del método de ensayo contribuye a garantizar que un método propuesto modificado o similar se basa en los mismos conceptos que el MVR correspondiente (9). Los componentes fundamentales del método de ensayo se describen con detalle en los puntos 16 a 21 del ME y los ensayos deben realizarse atendiendo a los siguientes aspectos:

— Condiciones generales (punto 16)

— Condiciones funcionales, que incluyen:

— viabilidad (punto 17),

— función de barrera (punto 18),

— morfología (punto 19),

— reproducibilidad (punto 20), y

— control de calidad (punto 21).

II) **Lista mínima de sustancias de referencia**

7. Las sustancias de referencia se utilizan para determinar si la fiabilidad y la exactitud de un método propuesto similar o modificado, del que se haya demostrado que presenta una similitud al MVR suficiente desde el punto de vista estructural y funcional, o que represente una modificación poco importante de uno de los tres métodos validados, son comparables a las del MVR o mejores que estas (2) (8) (16) (23). Entre las veinte sustancias de referencia recomendadas que figuran en el cuadro 1 se encuentran sustancias representativas de diferentes clases químicas (es decir, categorías químicas basadas en grupos funcionales) y de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes). Las sustancias incluidas en esta lista comprenden diez sustancias de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE, y otras diez sustancias sin categoría, de las que tres son sustancias de la categoría optativa 3 del SGA de la ONU. Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 no se considera categoría ("sin categoría"). Las sustancias recogidas en el cuadro 1 se han elegido entre las sustancias utilizadas en la fase de optimización tras la prevalidación y en el estudio de validación del MVR, teniendo en cuenta los grupos funcionales químicos y el estado físico (14) (18). Estas sustancias de referencia representan el número mínimo de sustancias que deben utilizarse para evaluar la exactitud y la fiabilidad de un método propuesto similar o modificado, pero no deben utilizarse para el desarrollo de nuevos métodos. En situaciones en que no se disponga de alguna sustancia de la lista, se podrán utilizar otras sustancias para las que se disponga de datos de referencia *in vivo* adecuados, en principio del grupo de sustancias utilizadas en la fase de optimización tras la prevalidación o en el estudio de validación del MVR. Si así se desea, esta lista mínima de sustancias de referencia puede complementarse con sustancias adicionales representativas de otras clases químicas y para las que se disponga de datos de referencia *in vivo* adecuados, con el fin de evaluar mejor la exactitud del método propuesto.

([1]) DO L 225 de 21.8.2001, p. 1.

Cuadro 1

Lista mínima de sustancias de referencia para la determinación de los valores de exactitud y fiabilidad de los métodos similares o modificados de irritación cutánea con EhR [1]

Sustancia	Número CAS	Estado físico	Puntuación *in vivo*	Cat. MVR *in vitro*	Cat. SGA de la ONU o CLP de la UE *in vivo*
1-Bromo-4-clorobutano	6940-78-9	Líquido	0	Cat. 2	Sin categoría
Ftalato de dietilo	84-66-2	Líquido	0	Sin categoría	Sin categoría
Ácido naftaleno-acético	86-87-3	Sólido	0	Sin categoría	Sin categoría
Fenoxiacetato de alilo	7493-74-5	Líquido	0,3	Sin categoría	Sin categoría
Isopropanol	67-63-0	Líquido	0,3	Sin categoría	Sin categoría
4-Metil-tio-benzaldehído	3446-89-7	Líquido	1	Cat. 2	Sin categoría
Estearato de metilo	112-61-8	Sólido	1	Sin categoría	Sin categoría
Butirato de heptilo	5870-93-9	Líquido	1,7	Sin categoría	Sin categoría
Salicilato de hexilo	6259-76-3	Líquido	2	Sin categoría	Sin categoría
Cinamaldehído	104-55-2	Líquido	2	Cat. 2	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* [3]
1-decanol [2]	*112-30-1*	*Líquido*	*2,3*	*Cat. 2*	*Cat. 2*
Aldehído ciclámico	103-95-7	Líquido	2,3	Cat. 2	Cat. 2
1-Bromohexano	111-25-1	Líquido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Clorhidrato de 2-clorometil-3,5-dimetil-4-metoxipiridina	86604-75-3	Sólido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Disulfuro de di-n-propilo [2]	*629-19-6*	*Líquido*	*3*	*Sin categoría*	*Cat. 2*
Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %)	1310-58-3	Líquido	3	Cat. 2	Cat. 2
5-(1,1-Dimetiletil)-2-metilbencenotiol	7340-90-1	Líquido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Sólido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	Líquido	3,4	Cat. 2	Cat. 2
Tetracloroetileno	127-18-4	Líquido	4	Cat. 2	Cat. 2

[1] La elección de las sustancias se basa en los criterios siguientes: i) las sustancias se encuentran en el comercio, ii) son representativas de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes), iii) tienen una estructura química bien definida; iv) son representativas de los grupos funcionales químicos utilizados en el proceso de validación, y v) no están asociadas con un perfil extremadamente tóxico (por ejemplo, carcinogénesis o toxicidad para el sistema reproductor) ni con unos costes de eliminación prohibitivos.

[2] Sustancias que son irritantes en conejos pero para las que existen pruebas fiables de que no son irritantes en seres humanos (31) (32) (33).

[3] Con arreglo al SGA de la ONU, pero no en el CLP de la UE.

III) **Valores definidos de exactitud y fiabilidad**

8. A efectos de establecer la fiabilidad y pertinencia de métodos propuestos similares o modificados que se vayan a transferir entre laboratorios, es necesario ensayar la totalidad de las veinte sustancias de referencia del cuadro 1 en, al menos, tres laboratorios. Sin embargo, si el método propuesto se va a utilizar en un único laboratorio, no es necesario para la validación hacer el ensayo multilaboratorios. Sin embargo, es fundamental que tales estudios de validación sean evaluados independientemente por órganos de validación reconocidos internacionalmente, de acuerdo con directrices internacionales (9). En cada laboratorio, debe someterse a ensayo la totalidad de las veinte sustancias de referencia, en tres tandas independientes, realizadas con diferentes lotes del tejido y a intervalos suficientemente separados. Cada tanda debe consistir como mínimo en tres réplicas del tejido ensayadas en paralelo con cada sustancia problema, el CN y el CP.

9. El cálculo de los valores de fiabilidad y exactitud del método propuesto debe efectuarse atendiendo a la totalidad de los cuatro criterios recogidos a continuación, velando por que los valores de fiabilidad y pertinencia se calculen de forma coherente y definida con anterioridad:

   1. Para el cálculo de la variabilidad intra e interlaboratorios y de la capacidad de predicción (exactitud) del método se tendrán en cuenta únicamente los datos procedentes de secuencias de tandas completas.

   2. La clasificación final de cada sustancia de referencia en cada laboratorio participante debe obtenerse utilizando el valor medio de la viabilidad de las distintas tandas realizadas en una secuencia de tandas completa.

   3. Para el cálculo de la variabilidad interlaboratorios del método se tendrán en cuenta únicamente los datos obtenidos con sustancias que se hayan sometido a secuencias de tandas completas en todos los laboratorios participantes.

   4. El cálculo de los valores de exactitud se efectuará sobre la base de las predicciones individuales de los laboratorios obtenidas para las veinte sustancias de referencia por los distintos laboratorios participantes.

   En este contexto, una **secuencia de tandas** consiste en tres tandas independientes realizadas en un laboratorio con una sustancia problema. Una **secuencia de tandas completa** es una secuencia de tandas realizadas en un laboratorio con una sustancia problema cuando las tres tandas son válidas. Esto significa que una sola tanda inválida anula la validez de toda una secuencia de tres tandas.

Reproducibilidad intralaboratorios

10. La evaluación de la reproducibilidad intralaboratorios debe indicar que la concordancia de las clasificaciones (categoría 2 y "sin categoría" del SGA de la ONU o del CLP de la UE) obtenidas en tandas de ensayo diferentes e independientes, con las veinte sustancias de referencia, dentro de un mismo laboratorio, es igual o superior (≥) al 90 %.

Reproducibilidad interlaboratorios

11. Si el método propuesto se va a utilizar solamente en un laboratorio, no es fundamental evaluar la reproducibilidad interlaboratorios. En caso de que el método se vaya a transferir entre laboratorios, la concordancia de las clasificaciones (categoría 2 y "sin categoría" del SGA de la ONU o del CLP de la UE) obtenidas en tandas de ensayo diferentes e independientes, con las veinte sustancias de referencia, entre preferentemente un mínimo de tres laboratorios, debe ser igual o superior (≥) al 80 %.

Capacidad de predicción (exactitud)

12. La exactitud (sensibilidad, especificidad y exactitud general) del método propuesto similar o modificado debe ser comparable a la del MVR o mejor que esta, teniendo en cuenta la información adicional relativa a la pertinencia en la especie de interés (cuadro 2). La sensibilidad debe ser igual o superior (≥) al 80 % (2) (8) (23). Sin embargo, se aplica otra restricción específica a la sensibilidad del método *in vitro* propuesto, ya que solamente dos sustancias de la categoría 2 *in vivo*, el 1-decanol y el disulfuro de di-n-propilo, pueden ser clasificados erróneamente como "sin categoría" por más de un laboratorio participante. La especificidad debe ser igual o superior (≥) al 70 % (2) (8) (23). No hay ninguna otra restricción respecto a la especificidad del método *in vitro* propuesto, es decir, cualquier laboratorio participante puede clasificar erróneamente cualquier sustancia "sin categoría" *in vivo* siempre que la especificidad final del método de ensayo se mantenga dentro del rango aceptable. La exactitud general debe ser igual o superior (≥) al 75 % (2) (8) (23). Aunque la sensibilidad del MVR calculada con las veinte sustancias de referencia recogidas en el cuadro 1 sea igual al 90 %, el valor mínimo definido de sensibilidad que se exige para que un método similar o modificado se considere válido está fijado en el 80 %, ya que se sabe que tanto el 1-decanol (sustancia dudosa) como el disulfuro de di-n-propilo (falso negativo en el MVR) no son irritantes para los seres humanos (31) (32) (33), aunque estén identificados como irritantes en la prueba con conejos. Como los modelos de EhR están basados en células de origen humano, es posible que clasifiquen estas sustancias como no irritantes ("sin categoría" según el SGA de la ONU o el CLP de la UE).

Cuadro 2

Valores requeridos de capacidad de predicción en cuanto a la sensibilidad, especificidad y exactitud general para que un método similar o modificado se considere válido

Sensibilidad	Especificidad	Exactitud general
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Criterios de aceptación del estudio

13. Es posible que uno o varios de los ensayos correspondientes a una o más sustancias problema no cumplan los criterios de aceptación del ensayo en cuanto a las sustancias problema y de control, o no sean aceptables por otros motivos. Para completar los datos que falten respecto a cada sustancia problema se puede efectuar un máximo de dos ensayos adicionales (repeticiones del ensayo). Más precisamente, como en caso de repetición del ensayo también hay que ensayar en paralelo el CP y el CN, puede realizarse un máximo de dos tandas adicionales para cada sustancia problema.

14. No hay que descartar que, incluso después de repetir el ensayo, no se obtenga el número mínimo de tres tandas válidas requerido para cada sustancia estudiada en relación con cada sustancia de referencia en cada uno de los laboratorios participantes, lo que dejaría incompleto el cuadro de datos. En tales casos, deben cumplirse los siguientes tres criterios conjuntamente para poder considerar aceptables los conjuntos de datos:

    1. Cada una de las veinte sustancias de referencia debe tener al menos una secuencia de tandas completa.

    2. En cada uno de los, como mínimo, tres laboratorios participantes, debe completarse un mínimo del 85 % de las secuencias de tandas (con veinte sustancias, esto significa que en un mismo laboratorio se pueden producir tres secuencias de tandas inválidas).

    3. Es necesario que se complete como mínimo el 90 % de todas las posibles secuencias de tandas de los, como mínimo, tres laboratorios (con veinte sustancias ensayadas en tres laboratorios, esto equivale a permitir un total de seis secuencias de tandas inválidas).»

3) Se añaden los siguientes capítulos:

«**B.49. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO***

INTRODUCCIÓN

1. El ensayo de micronúcleos *in vitro* (MNvit) es un ensayo de genotoxicidad para la detección de micronúcleos (MN) en el citoplasma de células en interfase. Los micronúcleos pueden proceder de fragmentos cromosómicos acéntricos (es decir, que carecen de centrómero) o de cromosomas completos que no pueden migrar a los polos durante la anafase de la división celular. El ensayo detecta la actividad de productos químicos clastogénicos y aneugénicos (sustancias y mezclas) (1) (2) en células que han sufrido la división celular durante la exposición a la sustancia problema o después de la misma. El presente método de ensayo (ME) permite el uso de protocolos con y sin citocalasina B (citoB), que es un inhibidor de la polimerización de la actina. La adición de citoB antes de la mitosis diana permite la identificación y el análisis selectivo de la frecuencia de micronúcleos en las células que han completado una sola mitosis porque dichas células son binucleadas (3) (4). Este ME permite también el uso de protocolos sin bloqueo de la citocinesis, siempre que haya pruebas de que la población celular analizada ha experimentado la mitosis.

2. Además de utilizar el ensayo de MNvit para identificar productos químicos (sustancias y mezclas) que inducen micronúcleos, el uso del bloqueo de la citocinesis, del etiquetado inmunoquímico de cinetocoros, o de la hibridación con sondas centroméricas o teloméricas [hibridación fluorescente *in situ* (FISH)] puede aportar también información sobre los mecanismos del daño cromosómico y de la formación de micronúcleos (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Los procedimientos de etiquetado e hibridación pueden utilizarse cuando hay un aumento en la formación de micronúcleos y el investigador desea determinar si el aumento es consecuencia de sucesos clastogénicos o aneugénicos.

3. Los micronúcleos representan un daño que se ha transmitido a las células hijas, mientras que las aberraciones cromosómicas registradas en las células en metafase pueden no transmitirse. Debido a que los micronúcleos de las células en interfase pueden evaluarse de forma relativamente objetiva, el personal de laboratorio solamente tiene que determinar si las células han sufrido o no la división y cuántas células contienen un micronúcleo. Como resultado, las preparaciones pueden evaluarse de forma relativamente rápida y el análisis puede automatizarse. Esto hace que sea factible evaluar miles en lugar de cientos de células por tratamiento, lo que aumenta el poder del ensayo. Finalmente, como los micronúcleos pueden derivarse de cromosomas retardados, existe la posibilidad de detectar agentes inductores de aneuploidía que son difíciles de estudiar en ensayos convencionales de aberraciones cromosómicas como, por ejemplo, la TG 473 de la OCDE (capítulo B.10 del presente anexo) (17). Sin embargo, el ensayo de MNvit no permite diferenciar las sustancias que inducen poliploidía de las que inducen efectos clastogénicos sin recurrir a técnicas especiales como la FISH mencionada en el punto 2.

4. El ensayo de MNvit es un método *in vitro* que utiliza normalmente células cultivadas de roedor o humanas. Proporciona una base general para investigar el potencial de causar daño cromosómico*in vitro* porque permite detectar tanto anéugenos como clastógenos.

5. El ensayo de MNvit es sólido y efectivo con una diversidad de tipos celulares, y tanto en presencia como en ausencia de citoB. Hay muchos datos que apoyan la validez del ensayo de MNvit con diversas líneas celulares de roedor (CHO, V79, CHL/IU y L5178Y) y con linfocitos humanos (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Aquí se incluyen, en particular, los estudios internacionales de validación coordinados por la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) y los informes del International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Los datos disponibles también se han vuelto a evaluar en un estudio de validación retrospectiva con ponderación de los datos, por parte del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) de la Comisión Europea, y el método de ensayo ha sido avalado en cuanto a su validez científica por el Comité científico consultivo del CEVMA (ESAC) (32) (33) (34). Se ha descrito el uso de la línea celular linfoblastoide humana TK6 (35), de células HepG2 (36) (37) y de células primarias de embrión de hámster sirio (38), aunque no se han utilizado en los estudios de validación.

DEFINICIONES

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

CONSIDERACIONES INICIALES

7. Los ensayos realizados *in vitro* suelen exigir la utilización de una fuente exógena de activación metabólica, salvo que las células sean competentes metabólicamente respecto a las sustancias que se ensayan. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*. Debe procurarse también evitar las circunstancias que puedan conducir a resultados falsos positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca y que puedan deberse a factores tales como cambios en el pH o en la osmolalidad, o a altos niveles de citotoxicidad (39) (40) (41). Si la sustancia problema provoca un cambio en el pH del medio en el momento de su incorporación, hay que ajustar el pH, preferentemente amortiguando la solución madre de forma que todos los volúmenes en todas las concentraciones de ensayo, y respecto a todos los controles, se mantengan iguales.

8. Para analizar la inducción de la formación de micronúcleos, es fundamental que haya habido mitosis en los cultivos tanto tratados como sin tratar. La fase que proporciona más información para evaluar la formación de micronúcleos es la de las células que han completado una sola mitosis durante el tratamiento con la sustancia problema, o después de este tratamiento.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

9. Los cultivos celulares de origen humano o de mamífero se exponen a la sustancia problema tanto con una fuente exógena de activación metabólica como sin ella, salvo que se utilicen células con una capacidad adecuada de metabolización. En todos los ensayos se incluyen un control positivo (CP) y un control del disolvente o vehículo (CV) en paralelo.

10. Durante la exposición a la sustancia problema, o después de la misma, las células se cultivan durante un tiempo suficiente para que el daño cromosómico o del huso acromático provoquen la formación de micronúcleos en las células en interfase. Para la inducción de aneuploidía, es necesario normalmente que la sustancia problema esté presente durante la mitosis. Las células en interfase se recogen, se tiñen y se analizan para detectar la presencia de micronúcleos. Lo ideal es que los micronúcleos se evalúen solamente en las células que hayan completado la mitosis durante la exposición a la sustancia problema o durante el período tras la exposición, en su caso. En los cultivos que se hayan tratado con un bloqueante de la citocinesis, esto se consigue evaluando únicamente las células binucleadas. En ausencia de bloqueante de la citocinesis es importante demostrar la probabilidad de que las células analizadas hayan experimentado la división celular durante la exposición a la sustancia problema o después de dicha exposición. En relación con todos los protocolos, es importante demostrar que ha habido proliferación celular en los cultivos tanto tratados como de control, y el grado de citotoxicidad o citostasis inducido por la sustancia problema debe estimarse en los cultivos (o en cultivos paralelos) que se examinan para evaluar la presencia de micronúcleos en ellos.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Preparativos

11. Pueden utilizarse cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana (5) (19) (42) (43) y una serie de líneas celulares de roedor, tales como CHO, V79, CHL/IU, y L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). El uso de otros tipos y líneas celulares debe justificarse por la demostración de su comportamiento en el ensayo, como se describe en la sección de criterios de aceptabilidad. Como la frecuencia espontánea de la formación de micronúcleos influye en la sensibilidad del ensayo, se recomienda la utilización de tipos celulares con una frecuencia espontánea de micronúcleos que sea baja y estable.

12. Los linfocitos de sangre periférica humana deben obtenerse de individuos no fumadores, sanos, jóvenes (de entre 18 y 35 años de edad, aproximadamente), que no hayan estado expuestos recientemente a radiaciones ni a sustancias genotóxicas conocidas. Si se combinan las células procedentes de más de un donante, debe especificarse el número de donantes. La frecuencia de micronúcleos aumenta con la edad y esta tendencia es más pronunciada en las mujeres que en los varones (44), lo que debe tenerse en cuenta al efectuar la selección de las células de los donantes para su combinación.

Medios y condiciones de cultivo

13. Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación (recipientes de cultivo, concentración de CO_2, temperatura y humedad) adecuados. Las cepas y líneas celulares establecidas deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por micoplasmas, y deben dejar de utilizarse si se contaminan o si hay un cambio en el número modal de cromosomas. Debe conocerse la duración del ciclo celular normal en las condiciones de cultivo aplicadas en el laboratorio de ensayo. Si se utiliza el método de bloqueo de la citocinesis, la concentración del inhibidor de la citocinesis debe optimizarse para el tipo de células específico que se utilice y debe demostrarse que proporciona un buen rendimiento de células binucleadas para la evaluación.

Preparación de los cultivos

14. Cepas y líneas celulares establecidas: las células se propagan a partir de cultivos madre, se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que los cultivos no lleguen a confluir en monocapas, y los cultivos en suspensión no alcancen una densidad excesiva antes del momento de la recogida, y se incuban a 37 °C.

15. Linfocitos: se cultiva sangre completa tratada con un anticoagulante (por ejemplo, heparina), o bien linfocitos aislados, en presencia de un mitógeno [por ejemplo, fitohemaglutinina (PHA)] antes de la exposición a la sustancia problema y a la citoB.

Activación metabólica

16. Se debe recurrir a sistemas de metabolización exógenos cuando se utilizan células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (45) (46) o una combinación de fenobarbital y β-naftoflavona (46) (47) (48) (49). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (50) ni el Reglamento (CE) nº 850/2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes (66), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir las oxidasas de función mixta (46) (47) (48) (49). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia que se estudia y, en algunos casos, puede ser adecuado utilizar más de una concentración de S9.

17. Las líneas celulares genéticamente modificadas que expresan enzimas de activación, humanas o de roedores, pueden suprimir la necesidad de utilizar un sistema de activación metabólica exógeno, y pueden utilizarse como células de ensayo. En estos casos, la elección de las líneas celulares utilizadas debe justificarse científicamente, por ejemplo, por la pertinencia de las oxidasas de función mixta para el metabolismo de la sustancia problema (51), y por su capacidad de respuesta a clastógenos y aneúgenos conocidos (véase la sección sobre criterios de aceptabilidad). Debe reconocerse que la sustancia estudiada puede no ser metabolizada por la oxidasa u oxidasas de función mixta expresadas; en este caso, los resultados negativos no indicarían que la sustancia problema no puede inducir micronúcleos.

Preparación de la sustancia problema

18. Las sustancias sólidas deben disolverse en disolventes o vehículos adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento. Las sustancias gaseosas o volátiles deben ensayarse aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes sellados (52) (53). Han de emplearse soluciones de la sustancia problema recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible su conservación.

Condiciones del ensayo

Disolvente o vehículo

19. El disolvente o vehículo no debe reaccionar con la sustancia problema ni ser incompatible con la supervivencia de las células ni con el mantenimiento de la actividad de la fracción S9 a la concentración utilizada. Para utilizar algún disolvente o vehículo distinto de los bien establecidos (por ejemplo, agua, medio de cultivo celular, dimetilsulfóxido), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con la sustancia problema y su ausencia de toxicidad genética. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

Utilización de citoB como bloqueante de la citocinesis

20. Una de las consideraciones más importantes en la realización del ensayo de MNvit es la de velar por que las células que se examinen hayan completado la mitosis durante el tratamiento o en el período de incubación tras el mismo, en su caso. La citoB es el agente más ampliamente utilizado para bloquear la citocinesis, ya que inhibe el ensamblaje de la actina, con lo que impide la separación de las células hijas tras la mitosis, y así se forman células binucleadas (5) (54) (55). Así pues, el recuento de micronúcleos puede limitarse a las células que han experimentado la mitosis durante el tratamiento o después de este. El efecto de la sustancia problema sobre la cinética de la proliferación celular puede medirse simultáneamente. La citoB debe utilizarse como bloqueante de la citocinesis cuando se utilizan linfocitos humanos, ya que la duración de los ciclos celulares es variable dentro de los cultivos y entre los donantes, y debido a que no todos los linfocitos responden a la PHA. Al examinar líneas celulares, se han utilizado otros métodos para determinar si las células que se evalúan han experimentado la división; estos métodos se consideran más abajo (véase el punto 26).

21. El laboratorio debe determinar la concentración adecuada de citoB para cada tipo de células con el fin de conseguir la frecuencia óptima de células binucleadas en los cultivos de control del disolvente o vehículo. La concentración adecuada de citoB está generalmente entre 3 y 6 μg/ml.

Medición de la proliferación celular y de la citotoxicidad, y selección de las concentraciones de exposición

22. Cuando se determina la concentración máxima de sustancia problema que se va a estudiar, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas falsas, tales como las provocadas por una citotoxicidad excesiva, precipitación en el medio de cultivo, y cambios fuertes del pH o de la osmolalidad (39) (40) (41).

23. Se mide la proliferación celular para asegurarse de que las células tratadas han efectuado una mitosis durante el ensayo y de que los tratamientos se efectúan a los niveles adecuados de citotoxicidad (véase el punto 29). La citotoxicidad debe determinarse con y sin activación metabólica en las células que requieren activación metabólica, utilizando el aumento relativo del recuento de células (ARRC) o la duplicación relativa de la población (DRP) (véanse las fórmulas en el apéndice 2), salvo que se emplee la citoB. Cuando se emplea esta sustancia, es posible determinar la citotoxicidad utilizando el índice de replicación (IR) (véase la fórmula en el apéndice 2).

24. El tratamiento de los cultivos con citoB, junto con la medición de las frecuencias relativas de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas en el cultivo, constituye un método exacto de cuantificación del efecto sobre la proliferación celular y de la actividad citotóxica o citostática de un tratamiento (5), y garantiza que solamente se evalúan las células que se han dividido durante el tratamiento o después de este.

25. En los estudios con citoB, la citostasis o la citotoxicidad pueden cuantificarse mediante el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) (5) (26) (56), o pueden derivarse del IR de, al menos, 500 células por cultivo (véanse las fórmulas en el apéndice 2). Cuando se utiliza la citoB para evaluar la proliferación celular, hay que determinar el IPBC o el IR basándose en un mínimo de 500 células por cultivo. Estas mediciones, entre otras, pueden utilizarse para estimar la citotoxicidad comparando los valores obtenidos con los cultivos tratados y con los controles. La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad (por ejemplo, confluencia, número de células, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase) puede aportar información útil.

26. En los estudios sin citoB, es necesario demostrar que las células evaluadas en el cultivo se han dividido durante el tratamiento con la sustancia problema o tras este tratamiento; en caso contrario, pueden obtenerse respuestas negativas falsas. Entre los métodos que se han utilizado para garantizar que las células objeto de evaluación se han dividido figuran los siguientes: la incorporación y posterior detección de bromodesoxiuridina (BrdU) para identificar las células que se han replicado (57), la formación de clones cuando se tratan células de líneas celulares permanentes y se evalúan *in situ* en el portaobjetos de un microscopio [índice de proliferación (IP)] (25) (26) (27) (28), o la medición de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento de células (ARRC) u otros métodos comprobados (16) (56) (58) (59) (véanse las fórmulas en el apéndice 2). La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad o de la citostasis (por ejemplo, confluencia, número de células, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase) puede aportar información útil.

27. Deben evaluarse al menos tres concentraciones de ensayo analizables. Con este fin, puede ser necesario realizar el experimento utilizando un número mayor de concentraciones próximas entre sí y analizar la formación de micronúcleos en las concentraciones que aporten el rango apropiado de citotoxicidades. Otra estrategia posible consiste en efectuar un ensayo preliminar de citotoxicidad a fin de estrechar el rango para el ensayo definitivo.

28. El objetivo es que la concentración máxima provoque una citotoxicidad del 55 ± 5 %. Unos niveles más elevados podrían inducir daño cromosómico como efecto secundario de la citotoxicidad (60). Cuando se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben cubrir un rango que vaya desde la que provoca una citotoxicidad del 55 ± 5 % hasta la que no provoca citotoxicidad o solo débilmente.

29. Si no se observa citotoxicidad ni precipitado, la concentración de ensayo máxima debe corresponder a la más baja del grupo siguiente: 0,01 M, 5 mg/mL o 5 µl/mL. Las concentraciones seleccionadas para el análisis no deben estar separadas, en general, por un factor de más de 10. En el caso de sustancias problema que muestran una curva de concentración-respuesta de gran pendiente, puede ser necesario reducir más la separación entre las concentraciones de la sustancia problema, de forma que se evalúen cultivos en los rangos de toxicidad moderada y baja.

30. En caso de que la solubilidad constituya un factor limitante, la concentración máxima, si no está limitada por la citotoxicidad, debe ser la concentración más baja a la que un precipitado mínimo es visible en los cultivos, siempre que esto no interfiera con el recuento. La valoración de la precipitación debe realizarse con métodos como la microscopia óptica, anotando el precipitado que persiste, o el que aparece durante el cultivo (hacia el final del tratamiento).

Controles

31. En todos los experimentos deben incluirse controles positivos (CP) y del disolvente o vehículo en paralelo, con y sin activación metabólica.

32. Los CP son necesarios para demostrar la capacidad de las células utilizadas y del protocolo de ensayo para identificar clastógenos y aneúgenos, y confirmar la actividad metabólica del preparado de S9. Los CP deben emplear inductores conocidos de la formación de micronúcleos a concentraciones a las que se prevea que se van a obtener aumentos pequeños, pero reproducibles, sobre la frecuencia espontánea, y demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo. Las concentraciones de los CP deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados.

33. Debe utilizarse un clastógeno que requiera activación metabólica (por ejemplo, ciclofosfamida, benzo[a]pireno) para demostrar tanto la competencia metabólica como la capacidad del sistema de ensayo para detectar clastógenos. Si está justificado, pueden utilizarse otros CP. Debido a que algunos CP que necesitan activación metabólica pueden ser activos sin activación metabólica exógena en ciertas condiciones de tratamiento o en ciertas líneas celulares, la necesidad de activación metabólica y la actividad de la preparación de S9 deben probarse en la línea celular seleccionada y a las concentraciones seleccionadas.

34. Por el momento, no se conoce ningún aneúgeno que necesite activación metabólica para su actividad genotóxica (16). Como ejemplos de CP aceptados actualmente para la actividad aneugénica pueden citarse la colchicina y la vimblastina. Pueden utilizarse otras sustancias si inducen micronúcleos solamente, o principalmente, a través de su actividad aneugénica. Para evitar tener que recurrir a dos CP (para la clastogenicidad y para la aneugenicidad) sin activación metabólica, el control de aneugenicidad puede servir como CP sin S9, y el control de clastogenicidad puede utilizarse para comprobar la idoneidad del sistema de activación metabólica utilizado. En células que no requieren S9 deben utilizarse CP tanto para la clastogenicidad como para la aneugenicidad. En el apéndice 3 se recogen los CP sugeridos.

35. Puede considerarse la utilización de un CP en función de las clases químicas, si se dispone de sustancias adecuadas. Todos los CP utilizados deben ser adecuados para el tipo de células y para las condiciones de activación.

36. Deben incluirse controles del disolvente o vehículo para cada tiempo de recogida. Se realizarán asimismo controles negativos (CN) sin tratar (sin disolvente ni vehículo), salvo que exista información publicada o datos de los controles históricos del laboratorio que demuestre que, a las concentraciones utilizadas, el disolvente elegido no provoca efectos genotóxicos ni otro tipo de efectos nocivos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Pauta de tratamiento

37. Para maximizar la probabilidad de detectar un aneúgeno o un clastógeno que actúe en una fase específica del ciclo celular, es importante que se trate con la sustancia problema un número suficiente de células en todas las fases de su ciclo celular. Por tanto, es posible que la pauta de tratamiento de líneas celulares y de cultivos celulares primarios difiera en algunos aspectos de la aplicada a los linfocitos, que requieren estimulación mitogénica para empezar su ciclo celular; este tema se trata en los puntos 41 a 43 (16).

38. Una serie de consideraciones teóricas, junto con datos publicados (18), indica que la mayoría de los aneúgenos y clastógenos se detectan con un corto período de tratamiento, de entre 3 y 6 horas en presencia y ausencia de S9, seguido de la eliminación de la sustancia problema y de un período de crecimiento de entre 1,5 y 2,0 ciclos celulares (6). Las células se recogen a un tiempo equivalente a unas 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal (es decir, sin tratamiento), bien tras el inicio o bien al final del tratamiento (véase el cuadro 1). Los tiempos de la toma de muestras o los de recuperación pueden ampliarse si se sabe o se sospecha que la sustancia problema afecta a la duración del ciclo celular (por ejemplo, cuando se someten a ensayo análogos de nucleósidos).

39. Debido a la posible citotoxicidad de las preparaciones de S9 para las células de mamífero cultivadas, se aplica un tratamiento con exposición prolongada de 1,5-2,0 ciclos celulares normales solamente en ausencia de S9. En el tratamiento prolongado, se ofrecen opciones que permiten el tratamiento de las células con la sustancia problema en ausencia y en presencia de citoB. Estas opciones se refieren a situaciones en que puede haber preocupación respecto a posibles interacciones entre la sustancia problema y la citoB.

40. Las pautas sugeridas de tratamiento de las células se presentan en el cuadro 1. Estas pautas generales de tratamiento pueden modificarse en función de la estabilidad o reactividad de la sustancia problema o de las características particulares de crecimiento de las células utilizadas. Todos los tratamientos deben iniciarse y terminarse mientras las células están en la fase de crecimiento exponencial. Estas pautas se presentan con más detalle en los puntos 41 a 47 siguientes.

Cuadro 1

Tratamiento de las células y tiempos de recogida para el ensayo de MNvit

Linfocitos, células primarias y líneas celulares tratadas con citoB	+ S9	Tratar durante 3-6 horas en presencia de S9; retirar la fracción S9 y el medio de tratamiento; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.
	– S9 Exposición corta	Tratar durante 3-6 horas; retirar el medio de tratamiento; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.
	– S9 Exposición prolongada	*Opción A:* Tratar durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales en presencia de citoB; recoger al final del período de exposición. *Opción B:* Tratar durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales; retirar la sustancia problema; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.
Líneas celulares tratadas sin citoB (Igual que las pautas de tratamiento indicadas más arriba, salvo que no se añade citoB)		

Linfocitos, células primarias y líneas celulares tratadas con citoB

41. En el caso de los linfocitos, el enfoque más eficiente es iniciar la exposición a la sustancia problema a las 44-48 horas de la estimulación con PHA, cuando la sincronización del ciclo habrá desaparecido (5). En el ensayo inicial, se tratan las células durante 3 a 6 horas con la sustancia problema en ausencia y en presencia de S9. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco que contiene citoB, y las células se recogen cuando ha pasado un tiempo equivalente a 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

42. Si ambos ensayos iniciales de tratamiento corto (3-6 horas) son negativos o dudosos, se aplica un tratamiento posterior con exposición prolongada sin S9. Se dispone de dos opciones de tratamiento, que son igualmente aceptables. Sin embargo, podría ser más adecuado seguir la opción A en caso de linfocitos estimulados en que el crecimiento exponencial podría declinar a las 96 horas de la estimulación. Asimismo, los cultivos de células no deben haber alcanzado la confluencia en el momento del muestreo final en la opción B.

— Opción A: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales, y se recogen al final del período de tratamiento.

— Opción B: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen cuando han pasado otros 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

43. Las células primarias y las líneas celulares deben tratarse de forma similar a los linfocitos, salvo que no es necesario estimularlas con PHA durante 44-48 horas. Las células distintas de los linfocitos deben exponerse de forma tal que, al final del estudio, las células estén aún en fase de crecimiento logarítmico.

Líneas celulares tratadas sin citoB

44. Las células deben tratarse durante 3-6 horas en presencia y en ausencia de S9. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen al cabo de un tiempo equivalente a 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

45. Si ambos ensayos iniciales de tratamiento corto (3-6 horas) son negativos o dudosos, se aplica un tratamiento posterior con exposición prolongada (sin S9). Se dispone de dos opciones de tratamiento, que son igualmente aceptables.

— Opción A: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales, y se recogen al final del período de tratamiento.

— Opción B: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen cuando han pasado otros 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

46. En las monocapas, es posible que haya células mitóticas (identificables por su forma redondeada y por despegarse de la superficie) al final del tratamiento de 3-6 horas. Como las células mitóticas se despegan con facilidad, pueden perderse cuando se retira el medio que contiene la sustancia problema. Debe procurarse recogerlas cuando se lavan los cultivos, y devolverlas a estos, para evitar la pérdida de células en mitosis, y que podrían presentar micronúcleos, en el momento de la recogida final.

Número de cultivos

47. Los cultivos deben hacerse por duplicado con cada concentración de la sustancia problema y en el caso de los cultivos del vehículo o disolvente y del CN. Si se puede demostrar, sobre la base de datos históricos del laboratorio, que la diferencia entre los cultivos duplicados es mínima, cabe la posibilidad de que resulte aceptable un cultivo único. Si se utilizan cultivos únicos, se recomienda que se analice un número mayor de concentraciones.

Recogida de las células y preparación de los portaobjetos

48. Cada cultivo se recoge y se manipula por separado. La preparación de las células puede implicar un tratamiento hipotónico, pero esta fase no es necesaria si se consigue de otra manera una extensión adecuada de las células. Pueden usarse distintas técnicas para la preparación de los portaobjetos, siempre que lleven a la obtención de preparaciones celulares de buena calidad para su evaluación. Debe conservarse el citoplasma celular para poder detectar los micronúcleos y también (si se aplica el método de bloqueo de la citocinesis) identificar de forma fiable las células binucleadas.

49. Las preparaciones pueden teñirse siguiendo varios métodos, tales como la tinción de Giemsa o la aplicación de colorantes fluorescentes específicos del ADN (59). Si se emplea un colorante específico del ADN [por ejemplo, naranja de acridina (61) o Hoechst 33258 más pironina-Y (62)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN. Si resulta interesante obtener información sobre los mecanismos implicados en su formación, para identificar el contenido (cromosoma o fragmento cromosómico) de los micronúcleos pueden utilizarse anticuerpos anti-cinetocoro, la técnica FISH con sondas pancentroméricas de ADN o el etiquetado *in situ* del cebado con cebadores pancentroméricos específicos, junto con una tinción de contraste adecuada del ADN (15) (16). Pueden utilizarse otros métodos para diferenciar entre clastógenos y anéugenos, siempre que se haya comprobado que son eficaces.

Análisis

50. Antes de analizarlos al microscopio, se asigna un código independiente a todos los portaobjetos, incluidos los del disolvente o vehículo y los de los controles. Otra posibilidad es analizar las muestras codificadas utilizando un sistema automático de análisis de imágenes o citometría de flujo que esté validado.

51. En los cultivos tratados con citoB, deben analizarse las frecuencias de los micronúcleos en al menos 2 000 células binucleadas por cada concentración (al menos 1 000 células binucleadas por cultivo y dos cultivos por concentración). Si se utilizan cultivos únicos, deben evaluarse al menos 2 000 células binucleadas por concentración de cada cultivo. Si para la evaluación a cada concentración se dispone de un número sustancialmente inferior a 1 000 de células binucleadas por cultivo, o a 2 000 si se utiliza un cultivo único, y si no se detecta un aumento significativo de micronúcleos, debe repetirse el ensayo utilizando más células, o a concentraciones menos tóxicas, según sea más conveniente. Ha de procurarse no tener en cuenta para la evaluación las células binucleadas con formas irregulares o en las que los dos núcleos difieran mucho por su tamaño; tampoco deben confundirse las células binucleadas con células multinucleadas mal extendidas. Las células que contengan más de dos núcleos principales no deben tenerse en cuenta para el análisis de micronúcleos, ya que la frecuencia espontánea de micronúcleos puede ser más elevada en estas células (63) (64). Puede aceptarse incluir en la evaluación las células mononucleadas si se demuestra que la sustancia problema interfiere con la actividad de la citoB.

52. En las líneas celulares sometidas a ensayo sin tratamiento con citoB, debe evaluarse la presencia de micronúcleos en al menos 2 000 células por concentración (al menos 1 000 células por cultivo y dos cultivos por concentración). Cuando se utilice un cultivo único por concentración, se evaluarán al menos 2 000 células de cada cultivo.

53. Cuando se utiliza la citoB, para evaluar la proliferación celular hay que determinar el IPBC o el IR (véase el apéndice 2) basándose en un mínimo de 500 células por cultivo. Cuando se hacen los tratamientos en ausencia de citoB, es fundamental aportar pruebas de que las células que se están considerando han proliferado, como se indica en los puntos 24 a 27.

Criterios de aceptabilidad

54. Los laboratorios que se propongan utilizar el ensayo de MNvit descrito en el presente ME deben demostrar su capacidad de detectar de forma fiable y exacta las sustancias de actividad aneugénica y clastogénica conocida, con y sin activación metabólica, así como las que se sabe que son negativas, utilizando las sustancias de referencia del apéndice 3. Para demostrar su capacidad de aplicar el presente ME correctamente, el laboratorio debe aportar pruebas de que las células que se evalúan para la formación de micronúcleos han completado una sola división nuclear si el ensayo se lleva a cabo sin utilizar citoB.

55. Se recomienda utilizar las sustancias del apéndice 3·como sustancias de referencia. Pueden incluirse otras sustancias en lugar de las de la lista, o además de ellas, si se conoce su actividad y si inducen la formación de micronúcleos por los mismos mecanismos de acción, y si se demuestra que son pertinentes para las sustancias que se van a ensayar con el procedimiento de MNvit. La justificación podría incluir un estudio de validación en que se haya utilizado una amplia variedad de sustancias o que se haya centrado en un espectro más reducido basado en la clase química de la sustancia problema o en el mecanismo del daño que se estudie.

56. El control del disolvente o vehículo y los cultivos sin tratar deben mostrar de forma reproducible unas frecuencias bajas y consistentes de micronúcleos (normalmente, 5-25 micronúcleos/1 000 células para los tipos de células señalados en el punto 11). Es posible que otros tipos de células tengan diferentes rangos de respuestas, las cuales deben determinarse cuando se validen para su utilización en el ensayo de MNvit. Deben utilizarse los datos del CN, del disolvente y del CP para establecer los rangos de los controles históricos. Estos valores deben utilizarse en la toma de decisiones sobre la idoneidad de los CN o CP en paralelo para un experimento.

57. Si se proponen para el ensayo cambios en el protocolo que sean de poca importancia (por ejemplo, uso de técnicas de recuento automáticas en vez de manuales, uso de un nuevo tipo de células), será necesario demostrar la efectividad del cambio antes de que se pueda considerar que es aceptable la utilización del protocolo modificado. La demostración de la efectividad incluye la demostración de que pueden detectarse los principales mecanismos de rotura cromosómica y ganancia o pérdida de cromosomas, y de que pueden obtenerse resultados positivos y negativos apropiados para la clase de cada sustancia, o para la amplia gama de sustancias, que se van a ensayar.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

58. Si se utiliza la técnica de bloqueo de la citocinesis, para la evaluación de la inducción de micronúcleos se emplearán solo las frecuencias de las células binucleadas con micronúcleos (independientemente del número de micronúcleos por célula). El tener en cuenta para la evaluación cuántas células tienen uno, dos o más micronúcleos puede aportar información útil, pero no es obligatorio.

59. También deben medirse en paralelo la citotoxicidad o la citostasis para todos los cultivos tratados y los de control del disolvente o vehículo (58). Los valores del IPBC y del IR deben calcularse para todos los cultivos tratados y de control, como medidas de retraso del ciclo celular cuando se utiliza el método de bloqueo de la citocinesis. En ausencia de citoB, debe utilizarse la DRP o el ARRC o el IP (véase el apéndice 2).

60. Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

61. Las sustancias que inducen micronúcleos en el ensayo de MNvit pueden deber esta propiedad a su capacidad de inducir rotura cromosómica, pérdida de cromosomas, o una combinación de ambas. Para determinar si el mecanismo de inducción de micronúcleos se debe a actividad clastogénica y/o aneugénica, pueden realizarse análisis más detallados utilizando anticuerpos anti-cinetocoro, sondas *in situ* específicas del centrómero, u otros métodos.

Evaluación e interpretación de los resultados

62. No se requiere ninguna verificación mediante ensayos adicionales en caso de una respuesta positiva o negativa clara. Los resultados dudosos pueden aclararse mediante el análisis de otras 1 000 células procedentes de todos los cultivos, para mantener el carácter ciego del ensayo. Si con este enfoque no se resuelve el resultado, deben efectuarse más ensayos. En los siguientes experimentos se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio en una gama de condiciones ampliada o restringida, según proceda. Entre los parámetros del estudio que podrían modificarse figuran el espaciado entre las concentraciones del ensayo, los períodos de tratamiento y de recogida de las células, o las condiciones de activación metabólica.

63. Son varios los criterios para determinar un resultado positivo, tales como un aumento relacionado con la concentración o un aumento estadísticamente significativo del número de células que presentan micronúcleos. Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. 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. Pueden emplearse métodos estadísticos adecuados como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (65). Sin embargo, los resultados de las pruebas estadísticas deben evaluarse respecto a la relación dosis-respuesta. También deben tenerse en cuenta la reproducibilidad y los datos históricos.

64. Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia problema. Estas respuestas dudosas o cuestionables pueden darse con independencia del número de veces que se repita el experimento.

65. Un resultado positivo en el ensayo de MNvit indica que la sustancia problema induce roturas cromosómicas o pérdida de cromosomas en células de mamífero cultivadas. Un resultado negativo indica que, en las condiciones en que se realiza el ensayo, la sustancia problema no induce roturas cromosómicas ni pérdida o ganancia de cromosomas en las células de mamífero cultivadas.

Informe del ensayo

66. El informe del ensayo debe incluir como mínimo la siguiente información, si es importante para la realización del estudio:

Sustancia problema:

— datos de identificación y número de registro del Chemical Abstracts Service y número CE,

— naturaleza física y pureza,

— propiedades físico-químicas importantes para la realización del estudio,

— reactividad de la sustancia problema con el disolvente o vehículo o con el medio de cultivo de las células.

Disolvente o vehículo:

— justificación de la elección del disolvente o vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en el disolvente o vehículo.

Células:

— tipo y procedencia de las células utilizadas,

— idoneidad del tipo de células utilizado,

— ausencia de micoplasmas, si procede,

— información sobre la duración del ciclo celular, tiempo de duplicación o índice de proliferación,

— en caso de que se utilicen linfocitos, indicación del sexo, edad, y número de los donantes de sangre, si procede,

— en caso de que se utilicen linfocitos, si lo que se expone a la sustancia es la sangre completa o son los linfocitos aislados,

— número de pases, si procede,

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares, si procede,

— número modal de cromosomas,

— duración del ciclo celular normal (control negativo).

Condiciones del ensayo:

— identidad de la sustancia de bloqueo de la citocinesis (por ejemplo, citoB), si se utiliza, y su concentración, junto con la duración de la exposición de las células,

— justificación de la selección de las concentraciones y del número de cultivos, incluidos los datos de citotoxicidad y los límites de solubilidad, si se dispone de ellos,

— composición del medio, concentración de CO_2, si procede,

— concentraciones de la sustancia problema,

— concentración (y volumen) del vehículo y de la sustancia problema añadidos,

— temperatura y duración de la incubación,

— duración del tratamiento,

— momento de la recogida tras el tratamiento,

— densidad celular en el momento de la siembra, si procede,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— sustancias de control positivo y controles negativos,

— métodos de preparación de los portaobjetos y técnica de tinción utilizados,

— criterios para la identificación de micronúcleos,

— números de células analizadas,

— métodos de determinación de la citotoxicidad,

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad,

— criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos,

— métodos utilizados de análisis estadístico,

— métodos, como la utilización de anticuerpos anti-cinetocoro, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentos, en su caso.

Resultados:

— parámetro utilizado para medir la citotoxicidad como, por ejemplo, IPBC o IR en caso de aplicación de bloqueo de la citocinesis, o ARRC, DRP o IP cuando no se aplica este bloqueo; otras observaciones pertinentes como, por ejemplo, confluencia celular, apoptosis, necrosis, recuento de metafases, frecuencia de células binucleadas,

— signos de precipitación,

— datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado,

— definición de células aceptables para el análisis,

— distribución de las células mono, bi y multinucleadas si se utiliza un método de bloqueo de la citocinesis,

— número de células con micronúcleos, indicado por separado para cada cultivo tratado y de control, precisándose si corresponden a células binucleadas o mononucleadas, en su caso,

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible,

— datos del control negativo (disolvente o vehículo) y de la sustancia de control positivo (concentraciones y disolventes) en paralelo,

— datos históricos del control negativo (disolvente o vehículo) y de las sustancias utilizadas como control positivo, con los rangos, las medias y la desviación típica e intervalo de confianza (por ejemplo, 95 %),

— análisis estadístico; valores p, si se dispone de ellos.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2*(5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

(17) OCDE (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells-results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) CEVMA (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the*in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) PNUMA (2001), Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en la dirección: [http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro:* Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

(66) Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE, DO L 229 de 30.4.2004, p. 5.

Apéndice 1

Definiciones

Anéugeno: Sustancia o proceso que, por interacción con los componentes del ciclo de división celular mitótica y meiótica, produce aneuploidía en células u organismos.

Aneuploidía: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas en relación con uno o varios cromosomas, pero no con dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

Apoptosis: Muerte celular programada, caracterizada por una serie de fases que llevan a la desintegración de las células para formar partículas limitadas por membranas que se eliminan a continuación por fagocitosis o por liberación.

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado de divisiones celulares mitóticas.

Centrómero: Región del ADN de un cromosoma en la que se mantienen juntas las dos cromátidas y a la que se unen lateralmente los dos cinetocoros.

Clastógeno: Sustancia o proceso que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

Citocinesis: Proceso de división celular que sigue inmediatamente a la mitosis para formar dos células hijas, cada una de las cuales contiene un solo núcleo.

Índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC, o CBPI, por su nombre en inglés): Proporción de células de segunda división en la población tratada con respecto al control sin tratar (véase la fórmula en el apéndice 2).

Citostasis: Inhibición del crecimiento celular (véase la fórmula en el apéndice 2).

Citotoxicidad: Efecto nocivo para la función o la estructura celular, que provoca finalmente la muerte de la célula.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de daño al ADN o al cromosoma, incluidas roturas, reorganizaciones de aductos, mutaciones, aberraciones cromosómicas, y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en daño cromosómico estable.

Células en interfase: Células que no se encuentran en fase mitótica.

Cinetocoro: Estructura proteínica que se encuentra en el centrómero de un cromosoma y a la cual se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Micronúcleos: Núcleos pequeños, adicionales a los núcleos principales de las células y separados de ellos, y producidos durante la telofase de la mitosis o de la meiosis por fragmentos cromosómicos o por cromosomas enteros retardados.

Mitosis: División del núcleo de la célula, generalmente formada por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

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

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

No disyunción: Caso en que las cromátidas emparejadas no se separan ni se segregan adecuadamente para repartirse entre las células hijas en formación, lo que provoca que las células hijas presenten un número anormal de cromosomas.

Poliploidía: Aberraciones cromosómicas numéricas en células u organismos que afectan a dotaciones completas de cromosomas, en contraste con las aberraciones que afectan solo a cromosomas individuales (aneuploidía).

Índice de proliferación (IP): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Aumento relativo del recuento de células (ARRC, o RICC por su nombre en inglés): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Duplicación relativa de la población (DRP, o RPD por su nombre en inglés): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Índice de replicación (IR): Proporción de ciclos de división celular completados en un cultivo tratado con respecto al control sin tratar, durante el período de exposición y de recuperación (véase la fórmula en el apéndice 2).

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

Apéndice 2

Fórmulas para la evaluación de la citotoxicidad

1. *Cuando se utiliza citoB,* la evaluación de la citotoxicidad debe basarse en el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) o en el índice de replicación (IR) (16) (58). El IPBC indica el número medio de ciclos celulares por célula durante el período de exposición a la citoB, y puede utilizarse para calcular la proliferación celular. El IR indica el número de núcleos presentes en los cultivos tratados respecto al de los cultivos de control y puede utilizarse para calcular el porcentaje de citostasis:

$$\% \text{ citostasis} = 100 - 100\{(IPBC_T - 1) \div (IPBC_C - 1)\}$$

donde:

T = cultivo de tratamiento de la sustancia problema
C = cultivo de control del vehículo

y:

$$IPBC = \frac{((\text{nº células mononucleadas}) + (2 \times \text{nº células binucleadas}) + (3 \times \text{nº células multinucleadas}))}{(\text{número total de células})}$$

Así pues, un IPBC de 1 (todas las células son mononucleadas) es equivalente al 100 % de citostasis.

$$\text{Citostasis} = 100 - IR$$

$$IR = \frac{((\text{nº células binucleadas}) + (2 \times \text{nº células multinucleadas})) \div (\text{nº células totales})_T}{((\text{nº células binucleadas}) + (2 \times \text{nº células multinucleadas})) \div (\text{nº células totales})_C} \times 100$$

donde:

T = cultivos tratados
C = cultivos de control

2. Así pues, un IR del 53 % significa que, respecto al número de células que se han dividido para formar células binucleadas y multinucleadas en el cultivo de control, solo el 53 % de este número se ha dividido en el cultivo tratado, es decir, hay un 47 % de citostasis.

3. *Cuando no se utiliza citoB,* se recomienda evaluar la citotoxicidad sobre la base del aumento relativo del recuento celular (ARRC) o de la duplicación relativa de la población (DRP) (58), ya que ambos parámetros tienen en cuenta la proporción de la población celular que se ha dividido.

$$ARRC = \frac{(\text{Aumento del número de células en los cultivos tratados (nº final} - \text{nº inicial}))}{(\text{Aumento del número de células en los cultivos de control (nº final} - \text{nº inicial}))} \times 100$$

$$DRP = \frac{(\text{no de duplicaciones de la población en los cultivos tratados})}{(\text{no de duplicaciones de la población en los cultivos de control})} \times 100$$

donde:

$$\text{Duplicación de la población} = [\log(\text{nº células tras el tratamiento} \div \text{nº células iniciales})] \div \log 2$$

4. Así pues, un ARRC o una DRP del 53 % indica un 47 % de citotoxicidad o citostasis.

5. Si se utiliza el índice de proliferación (IP), es posible evaluar la citotoxicidad mediante el recuento de los clones formados por una célula (cl1), dos células (cl2), de tres a cuatro células (cl4) y de cinco a ocho células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. El IP se ha utilizado como un parámetro válido y fiable de citotoxicidad también para líneas celulares cultivadas *in situ* en ausencia de citoB (25) (26) (27) (28).

Apéndice 3

Sustancias de referencia recomendadas para evaluar el comportamiento [1]

Categoría	Sustancia	Nº CAS	Nº CE
1. Clastógenos activos sin activación metabólica			
	Arabinósido de citosina	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastógenos que necesitan activación metabólica			
	Benzo(a)pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
3. Anéugenos			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vimblastina	143-67-9	205-606-0
4. Sustancias negativas			
	Ftalato de di-(2-etilhexilo)	117-81-7	204-211-0
	Ácido nalidíxico	389-08-2	206-864-7
	Pireno	129-00-0	204-927-3
	Cloruro sódico	7647-14-5	231-598-3

[1] Las sustancias de referencia son aquellas cuyo uso se recomienda. Pueden incluirse otras sustancias en lugar de las de la lista de sustancias de referencia, o además de ellas, si se conoce su actividad y si inducen la formación de micronúcleos por los mismos mecanismos de acción, y si se demuestra que son pertinentes para las sustancias que se van a ensayar con el procedimiento de MNvit. En función del objetivo, la justificación podría incluir asimismo un estudio de validación en que se haya utilizado una amplia variedad de sustancias o que se haya centrado en un espectro más reducido basado en la clase química de la sustancia problema o en el mecanismo del daño que se estudie.

B.50. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: DA

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: DA (desarrollado por Daicel Chemical Industries, Ltd.) es una modificación no radiactiva del LLNA, en la que se cuantifica mediante bioluminiscencia el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador de la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: DA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12) (13). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (14). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442 A de la OCDE) y el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422 B de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: DA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14).

DEFINICIONES

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

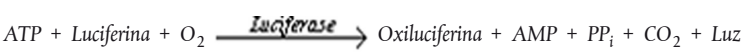
CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: DA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: DA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (14) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: DA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). 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 química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: DA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: DA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: DA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14). Además, el LLNA: DA supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: DA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (16) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (14). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: DA (10). Además, puede que no sea apropiado recurrir al LLNA: DA para ensayar sustancias que afectan a los niveles de ATP (por ejemplo, sustancias que actúan como inhibidores del ATP) o en aquellos casos en que se vea afectada la medición exacta del contenido de ATP intracelular (por ejemplo, presencia de enzimas que degradan el ATP, presencia de ATP extracelular en el ganglio linfático). Dejando aparte estas limitaciones identificadas, el LLNA: DA debe ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que esta tenga propiedades asociadas que puedan interferir con la exactitud del LLNA: DA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,8 y 2,5 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 44 sustancias utilizando un IE ≥ 1,8 (véase el punto 6) de las que el LLNA: DA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente tres de los doce productos no sensibilizantes con valores del IE entre 1,8 y 2,5 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: DA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,8 para que se pueda justificar el seguir con la evaluación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos descritos aquí se basan en el uso del contenido de ATP, medido por bioluminiscencia y del que se sabe que se corresponde con el número de células vivas (17), para indicar un aumento del número de células en proliferación en los ganglios linfáticos auriculares (18) (19). El método de bioluminiscencia utiliza la enzima luciferasa para catalizar la formación de luz a partir de ATP y luciferina de acuerdo con la siguiente reacción:



La intensidad de la luz emitida está relacionada linealmente con la concentración de ATP y se mide con un luminómetro. El ensayo con luciferina-luciferasa es un método sensible para cuantificar el ATP, utilizado en una amplia variedad de aplicaciones (20).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: DA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (12) (13). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: DA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (21), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: DA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta positiva en el LLNA: DA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE ≥ 1,8 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del control positivo debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 10 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del control positivo en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: DA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: DA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: DA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un control positivo en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de control positivo en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (22).

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (23). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: DA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (24). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (24) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (22). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar de los animales al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: DA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: DA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: DA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 8). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), el día 7 (24 horas antes del final) y el día 8. Además, el día 8 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un aumento del espesor de la oreja ≥ 25 % cualquiera de los días de medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: DA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación del eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 % que sean estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: DA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 8, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (36).

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. Se aplica al dorso de cada oreja una solución acuosa de laurilsulfato de sodio (LSS) al 1 %, utilizando un pincel impregnado con la solución de LSS de modo que con cuatro o cinco pinceladas se cubra todo el dorso de cada oreja. Una hora tras la aplicación del LSS, se aplican en el dorso de cada oreja 25 µL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2, 3 y 7:* Se repite el procedimiento de aplicación efectuado el día 1, con aplicación previa de la solución acuosa de LSS al 1 %, seguida de la aplicación de la sustancia problema.

— *Días 4, 5 y 6:* Sin tratamiento.

— *Día 8:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. Unas 24 o 30 horas tras el inicio de la aplicación del día 7, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se ponen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (22) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

Preparación de las suspensiones celulares

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos extirpados bilateralmente colocando los ganglios linfáticos entre dos portaobjetos de vidrio y aplicando una presión ligera, para aplastarlos. Tras confirmar que el tejido se ha extendido finamente, se separan los dos portaobjetos. Se suspende en LSS el tejido presente en ambos portaobjetos, poniéndolos en ángulo sobre una placa Petri y lavando con PBS, separando a la vez el tejido del portaobjetos con un raspador celular. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. Para el lavado de ambos portaobjetos debe utilizarse un volumen total de 1 mL de PBS. La suspensión de células de los ganglios linfáticos en la placa Petri debe homogeneizarse ligeramente con el raspador celular. Se toma a continuación con una micropipeta una alícuota de 20 µL de esta suspensión, procurando no incluir la membrana, visible a simple vista, y se mezcla después con 1,98 mL de PBS para obtener una muestra de 2 mL. Después se prepara otra muestra de 2 mL siguiendo el mismo procedimiento, de forma que de cada animal se obtienen dos muestras.

Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de ATP de los linfocitos)

27. Los aumentos del contenido de ATP en los ganglios linfáticos se miden con el método de la luciferina/luciferasa, utilizando un juego de medición de ATP, que mide la bioluminiscencia en unidades relativas de luminiscencia (URL). El tiempo transcurrido entre el momento del sacrificio de los animales y la medición del contenido de ATP de cada animal deber ser uniforme, y no sobrepasar aproximadamente los 30 minutos, porque se considera que el contenido de ATP va disminuyendo gradualmente según transcurre el tiempo a partir del sacrificio de los animales (12). Así pues, la serie de operaciones desde la extracción de los ganglios linfáticos auriculares hasta la medición del ATP debe efectuarse en el plazo de 20 minutos, siguiendo una pauta temporal preestablecida, que será la misma con todos los animales. Se debe medir la luminiscencia del ATP en cada muestra de 2 mL, de forma que de cada animal se efectúan dos mediciones del ATP. A continuación se determina la luminiscencia media del ATP, que es el valor utilizado para los cálculos posteriores (véase el punto 30).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (36).

Pesos corporales

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores de URL de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de URL de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad.

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,8 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,8 y 2,5) se declara positivo (2) (3) (37).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,8 y 2,5, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados “valores atípicos”).

DATOS E INFORME

Datos

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores de URL de cada animal, la media de los valores de URL de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control del disolvente o vehículo.

Informe del ensayo

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de medición del ATP, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante,

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— momento del sacrificio del animal y momento de la medición del ATP de cada animal,

— un cuadro con los valores de URL y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de URL/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no un sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (*2010*), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol*. 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(25) OCDE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) 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, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de "concordancia" se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (38).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Falso negativo: Sustancia identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

Falso positivo falso: Sustancia identificada incorrectamente como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (38).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (38).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (38).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

B.51. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: BrdU-ELISA

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA y una revisión de los trabajos relacionados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: BrdU-ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) es una modificación no radiactiva del LLNA que utiliza 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) sin marcado radiactivo (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) en un sistema de ensayo basado en el ELISA, para medir la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: BrdU-ELISA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de científicos independientes de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422B de la OCDE) y el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442A de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: BrdU-ELISA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin la necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13).

DEFINICIONES

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

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: BrdU-ELISA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: BrdU-ELISA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (13) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: BrdU-ELISA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). 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 química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: BrdU-ELISA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: BrdU-ELISA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: BrdU-ELISA es un método *in vivo*, por lo que no eliminará el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13). Además, el LLNA: BrdU-ELISA supone un refinamiento sustancial de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (capítulo B.6 del presente anexo, 13). Por consiguiente, el LLNA: BrdU-ELISA reduce las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: BrdU-ELISA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (15) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: BrdU-ELISA (10). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA: BrdU-ELISA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA: BrdU-ELISA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,6 y 1,9 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 43 sustancias utilizando un IE ≥ 1,6 (véase el punto 6) de las que el LLNA: BrdU-ELISA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente dos de los once productos no sensibilizantes con valores de IE entre 1,6 y 1,9 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: BrdU-ELISA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia química. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,6 para que se pueda justificar el seguir con la evaluación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en medir el contenido de BrdU y utilizarlo para indicar el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. El BrdU es un análogo de la timidina y se incorpora de forma similar en el ADN de las células en proliferación. La incorporación del BrdU se mide mediante ELISA, que utiliza un anticuerpo específico del BrdU, marcado también con peroxidasa. Cuando se añade el sustrato, la peroxidasa reacciona con este y se obtiene un producto coloreado, que se cuantifica a una absorbancia específica con un lector de placas de microtitulación.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: BrdU-ELISA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (10) (12). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: BrdU-ELISA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (16), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: BrdU-ELISA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar respuesta positiva en el LLNA: BrdU-ELISA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE ≥ 1,6 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 14 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº CAS 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: BrdU-ELISA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: BrdU-ELISA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: BrdU-ELISA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados de los CP.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (17).

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (18). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: BrdU-ELISA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y el vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (19). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (19) (20 y capítulo B.4 del presente anexo). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (17). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar animal al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: BrdU-ELISA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser una concentración del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (20, y capítulo B.4 del presente anexo). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un espesor de la oreja ≥ 25 % cualquiera de los días de medición (21) (22). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18) induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación de eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (21) (22), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (30) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: BrdU-ELISA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (31).

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 µL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Día 4:* Sin tratamiento.

— *Día 5:* Se inyectan por vía intraperitoneal 0,5 mL (5 mg/ratón) de una solución de BrdU (10 mg/mL).

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. A las 24 horas, aproximadamente, de la inyección de BrdU, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (17) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

Preparación de las suspensiones celulares

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extirpados bilateralmente, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 µm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas (por ejemplo, uso de un mortero de plástico desechable para aplastar los ganglios linfáticos, seguido del paso por una malla de nailon de 70 µm). El procedimiento de preparación de la suspensión de CGL es de importancia crítica en este ensayo y por tanto cada operario debe adquirir de forma anticipada habilidad para efectuarlo. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. En cada caso, el volumen final de la suspensión de CGL debe ajustarse a un volumen optimizado determinado (de unos 15 mL). El volumen optimizado se basa en lograr una absorbancia media del grupo de CN entre 0,1 y 0,2.

Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de BrdU en el ADN de los linfocitos)

27. El contenido de BrdU se mide mediante ELISA utilizando un juego comercial (por ejemplo, el de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11 647 229 001). En resumen, a los pocillos de una microplaca de fondo plano se añaden por triplicado 100 µL de la suspensión de CGL. Tras la fijación y desnaturalización de las CGL, se añade a cada pocillo anticuerpo anti-BrdU y se deja reaccionar. Después se elimina por lavado el anticuerpo anti-BrdU y, a continuación, se añade la solución de sustrato y se deja que se produzca el cromógeno. Entonces, se mide la absorbancia a 370 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm. En todos los casos, deben optimizarse las condiciones del ensayo (véase el punto 26).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (31).

Pesos corporales

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones del grupo de control del disolvente o vehículo (CV). El IE medio del CV es entonces la unidad.

El índice de marcado con BrdU se define de la manera siguiente:

$$\text{Índice de marcado con BrdU} = (\text{ABS}_{le} - \text{ABS blanco}_{le}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS blanco}_{ref})$$

donde: le = longitud de onda de emisión; y ref = longitud de onda de referencia.

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,6 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos del disolvente o vehículo y del CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,6 y 1,9) se declara positivo (3) (6) (32).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,6 y 1,9, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados "valores atípicos").

DATOS E INFORME

Datos

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores del índice de marcado con BrdU de cada animal, la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control de disolvente o vehículo.

Informe del ensayo

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de ELISA, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante (sensibilidad y especificidad del anticuerpo y límite de detección),

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores del índice de marcado con BrdU y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores del índice de marcado con BrdU/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) 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, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de "concordancia" se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (33).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características físicas y químicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Falso negativo: Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa (33).

Falso positivo: Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva (33).

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El *efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición*.

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo la misma sustancia problema pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (33).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (33).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (33).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.»

Precio de suscripción 2012 (sin IVA, gastos de envío ordinario incluidos)

Diario Oficial de la UE, series L + C, solo edición impresa	22 lenguas oficiales de la UE	1 200 EUR al año
Diario Oficial de la UE, series L + C, edición impresa + DVD anual	22 lenguas oficiales de la UE	1 310 EUR al año
Diario Oficial de la UE, serie L, solo edición impresa	22 lenguas oficiales de la UE	840 EUR al año
Diario Oficial de la UE, series L + C, DVD mensual (acumulativo)	22 lenguas oficiales de la UE	100 EUR al año
Suplemento del Diario Oficial (serie S: Anuncios de contratos públicos), DVD semanal	Plurilingüe: 23 lenguas oficiales de la UE	200 EUR al año
Diario Oficial de la UE, serie C: Oposiciones	Lengua(s) en función de la oposición	50 EUR al año

La suscripción al *Diario Oficial de la Unión Europea*, que se publica en las lenguas oficiales de la Unión Europea, está disponible en 22 versiones lingüísticas. Incluye las series L (Legislación) y C (Comunicaciones e informaciones).

Cada versión lingüística es objeto de una suscripción aparte.

Con arreglo al Reglamento (CE) nº 920/2005 del Consejo, publicado en el Diario Oficial L 156 de 18 de junio de 2005, que establece que las instituciones de la Unión Europea no estarán temporalmente vinculadas por la obligación de redactar todos los actos en irlandés y de publicarlos en esta lengua, los Diarios Oficiales publicados en lengua irlandesa se comercializan aparte.

La suscripción al Suplemento del Diario Oficial (serie S: Anuncios de contratos públicos) reagrupa las 23 versiones lingüísticas oficiales en un solo DVD plurilingüe.

Previa petición, las personas suscritas al *Diario Oficial de la Unión Europea* podrán recibir los anexos del Diario Oficial. La publicación de estos anexos se comunica mediante una «Nota al lector» insertada en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Venta y suscripciones

Las suscripciones a diversas publicaciones periódicas de pago, como la suscripción al *Diario Oficial de la Unión Europea*, están disponibles en nuestra red de distribuidores comerciales, cuya relación figura en la dirección siguiente de Internet:

http://publications.europa.eu/others/agents/index_es.htm

EUR-Lex (http://eur-lex.europa.eu) ofrece acceso directo y gratuito a la legislación de la Unión Europea. Desde este sitio puede consultarse el *Diario Oficial de la Unión Europea,* así como los Tratados, la legislación, la jurisprudencia y la legislación en preparación.

Para más información acerca de la Unión Europea, consulte: http://europa.eu

Oficina de Publicaciones de la Unión Europea
2985 Luxemburgo
LUXEMBURGO

ES