

MANUAL DE PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Basado en directrices internacionales de la ICH y la OCDE

Ana Yadhira González Chávez
Ana Fernanda Hernández Mora
Mauricio Alejandro García Castillo
Karla Jaime Rodríguez
Roberto Carlos Gutiérrez Hernández
Minerva Martínez Alfaro
Yolanda Alcaraz Contreras.

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



MANUAL DE PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Tabla de contenidos

1. Introducción	2
1.1 Antecedentes históricos.....	2
2. PRUEBAS DE CARCINOGENICIDAD.....	3
2.1 Objetivos	3
2.2 Consideraciones generales.....	3
2.3 Diseño experimental.....	4
2.4 Evaluación del ensayo.....	6
2.5 Recolección y análisis de datos.....	7
 2.5.1 Informe final.....	7
 2.5.2 Resultados	8
3. PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD	11
3.1 Objetivos	11
3.2 Consideraciones generales.....	11
3.3 Diseño experimental.....	12
3.4 Evaluación del ensayo.....	18
3.5 Recolección y análisis de datos.....	21
 3.5.1 Informe final.....	21
 3.5.2 Resultados	29
4. Consideraciones éticas	32
5. Glosario.....	32
6. Referencias bibliográficas	33



1. Introducción

El presente manual se ha desarrollado como una guía que resume los métodos para la evaluación de efectos cancerígenos y genotóxicos por sustancias como alimentos y fármacos. Su propósito principal es servir como una fuente informativa y de referencia en la evaluación de la seguridad de estos productos, con un enfoque específico en sus potenciales efectos carcinogénicos y genotóxicos.

Este documento se ha elaborado tomando como referencia a directrices internacionales de gran relevancia, particularmente las guías de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) sobre genotoxicidad y carcinogénesis, así como las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Estas referencias proporcionan un marco científico y regulatorio sólido, asegurando que los métodos y criterios presentados en este manual estén alineados con los estándares internacionales actualizados.

La carcinogénesis es un proceso multifásico que implica la iniciación, promoción y progresión de células anormales. Los mecanismos incluyen daño directo al ADN, alteraciones epigenéticas, estrés oxidativo y disrupción de vías de señalización celular. La genotoxicidad, por su parte, se refiere específicamente a la capacidad de los agentes para dañar el material genético, ya sea mediante mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas o aneuploidía. Los principios de genotoxicidad abarcan la identificación de lesiones primarias en el ADN, los sistemas de reparación celular y las consecuencias de los daños no reparados. La relación entre genotoxicidad y carcinogenicidad es estrecha, pero no absoluta; mientras que muchos carcinógenos son genotóxicos, actuando como iniciadores del proceso canceroso, otros pueden promover el crecimiento tumoral sin dañar directamente el ADN. Esta compleja interacción subraya la necesidad de un enfoque integral en la evaluación del potencial carcinogénico de las sustancias, combinando ensayos de genotoxicidad a corto plazo con estudios de carcinogenicidad a largo plazo.

A lo largo de este manual, se proporcionará una guía detallada sobre los métodos de evaluación, interpretación de resultados y consideraciones regulatorias, integrando prácticas recomendadas por la ICH y la OCDE. La estructura del manual permitirá a los usuarios acceder fácilmente a información relacionada a la evaluación de seguridad de sustancias de uso humano.

1.1 Antecedentes históricos

Los estudios de carcinogenicidad y genotoxicidad tienen una historia rica que se remonta a principios del siglo XX. El concepto de carcinogénesis química surgió en 1915 cuando Yamagiwa e Ichikawa indujeron cáncer en conejos mediante la aplicación repetida de alquitrán de hulla. Este descubrimiento marcó el inicio de la investigación sistemática sobre sustancias capaces de causar cáncer. La genotoxicidad, por su parte, comenzó a estudiarse en profundidad en la década de 1940, con los trabajos pioneros de Hermann Muller sobre mutaciones inducidas por rayos X en *Drosophila*. La importancia de estos estudios en el desarrollo de productos de consumo y uso humano se hizo evidente en la década de 1960, tras la tragedia de la talidomida, que impulsó una regulación más estricta de los fármacos y otros productos químicos.



La evolución de los marcos regulatorios para estos estudios ha sido gradual y compleja. En 1971, la OCDE comenzó a desarrollar directrices para pruebas de productos químicos, incluyendo métodos para evaluar la carcinogenicidad y la mutagenicidad. Estas directrices se han actualizado regularmente para incorporar los avances científicos y tecnológicos. Por otro lado, la ICH establecida en 1990, ha desempeñado un papel crucial en la estandarización de los requisitos para el registro de medicamentos. Las guías ICH S1A, S1B y S1C para estudios de carcinogenicidad, y la ICH S2 para genotoxicidad, han sido fundamentales para armonizar los enfoques regulatorios a nivel internacional. Esta evolución refleja un esfuerzo continuo por mejorar la seguridad de los productos destinados al uso humano, equilibrando la necesidad de protección del consumidor con el avance científico y tecnológico en un mundo cada vez más globalizado.

2. PRUEBAS DE CARCINOGENICIDAD

2.1 Objetivos

- La identificación de propiedades cancerígenas de una sustancia química, que resulta en un incremento de incidencia de neoplasias, mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo en la aparición de neoplasias, en comparación con grupos de control concurrentes.
- Identificar el o los órganos objetivo de la carcinogenicidad.
- Identificar el tiempo de aparición de las neoplasias.
- Caracterizar la relación dosis-respuesta del tumor.
- Identificar un nivel sin efectos adversos observados o punto de partida para el establecimiento de una dosis de referencia.
- Extrapolar los efectos cancerígenos a niveles de exposición humana en dosis bajas.

2.2 Consideraciones generales

En la evaluación del potencial carcinogénico de una sustancia química, el laboratorio de ensayo debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia antes de realizar el estudio, con el fin de seleccionar el método de ensayo más adecuado y comprobar de forma más eficiente el potencial carcinogénico de la sustancia.

La información relevante para el diseño del estudio se basa en la estructura química, las propiedades fisicoquímicas y ensayos de toxicidad de la sustancia y de otras estructuralmente relacionadas, además del uso previsto y del potencial de exposición humana.

Los métodos estadísticos para el análisis de los resultados se establecen antes de iniciar el estudio acorde a los métodos y objetivos del ensayo. Se deben considerar cuestiones como el ajuste por supervivencia, riesgos tumorales acumulativos, análisis del tiempo transcurrido hasta el tumor y el análisis de finalización prematura de uno o más grupos de ensayo.

Se recomienda seguir los principios expuestos en el Documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y el uso de signos clínicos como criterios de valoración para los animales de experimentación utilizados en la evaluación de la seguridad.

La estrategia de selección de la dosis básica depende del objetivo principal del estudio. Al seleccionar los niveles de dosis apropiados, debe lograrse un equilibrio entre la detección de peligros, y la caracterización de las respuestas a dosis bajas y su relevancia.

2.3 Diseño experimental

2.3.1 Bioensayo de carcinogenicidad a largo plazo

Directriz de prueba 451 de la OCDE

La elección de la especie animal para la evaluación de la carcinogenicidad debe ser justificada, la rata es la especie de roedor preferida debido a la corta vida, disponibilidad de cepas caracterizadas, susceptibilidad a inducción de tumores, practicidad para tomar muestras de sangre en serie, peso de órganos y uso en estudios farmacológicos y toxicológicos que amplían la información de su fisiología y patología.

La rata deberá ser un adulto joven, las hembras nulíparas y no preñadas, se usará la misma cepa de los estudios preliminares de toxicidad a menos que la cepa no cumpla con los criterios de supervivencia para estudios a largo plazo. El uso del ratón puede tener una utilidad limitada, sin embargo, se puede justificar por motivos mecanicistas, metabólicos o de otra índole como especie apropiada para el estudio de carcinogenicidad a largo plazo o para aumentar el peso de la evidencia con estudios de carcinogenicidad en dos especies de roedores.

La guía S1C del ICH proporciona los criterios para la selección de dosis del estudio de carcinogenicidad entre los cuales se encuentra la dosis máxima tolerada que es en la que se prevé que producirá un efecto tóxico mínimo durante el transcurso del estudio, los efectos farmacodinámicos limitantes de la dosis, la saturación de la absorción, la dosis máxima factible que es de 5% de la dieta y la dosis límite de 1500 mg/kg/día cuando la dosis humana máxima recomendada no excede los 500 mg/día. Se muestra a continuación en la figura 1 un esquema del ensayo de carcinogenicidad.

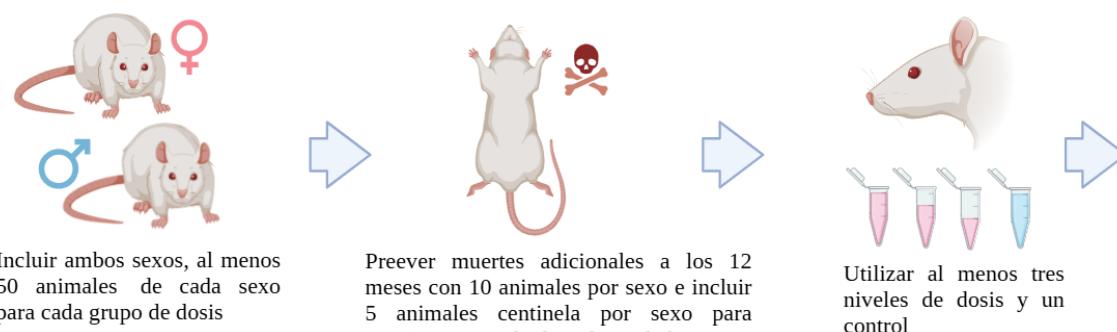




Figura 1. Esquema general donde se muestran las especies animales recomendadas, niveles de dosis, vías de administración y duración de estudio para evaluar la carcinogénesis

2.4 Evaluación del ensayo

Se evalúan los efectos tumorigénicos de la sustancia a la luz de la incidencia y latencia del tumor en los modelos de roedores, en el caso de fármacos se evalúa la farmacocinética en comparación con los humanos, y los datos de cualquier estudio informativo que sea de relevancia. Se presenta en la figura 2 un esquema de la evaluación del ensayo.

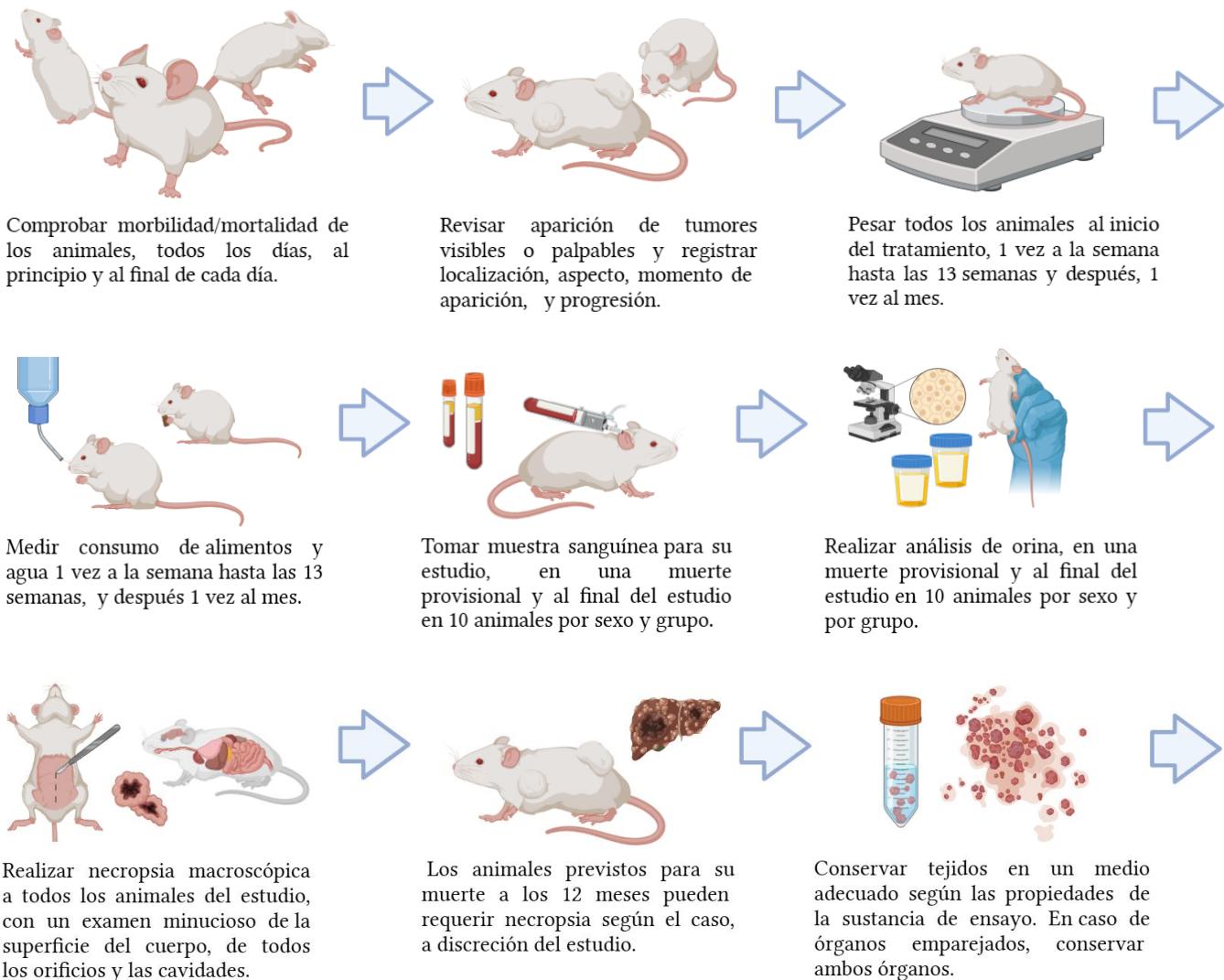


Figura 2. Esquema que señala la evaluación que se debe realizar a lo largo del estudio de carcinogénesis.

Los tejidos mínimos examinados deben ser aquellos de los grupos de dosis altas y de control; de los animales muertos o sacrificados durante el estudio; los que presenten anomalías macroscópicas, incluidos los tumores; cuando se observen cambios histopatológicos relacionados con el tratamiento en el grupo de dosis alta, esos mismos se examinarán en todos los animales de los demás grupos de dosis.



2.5 Recolección y análisis de datos

2.5.1 Informe final

A continuación, se muestra un formato guía para realizar el informe del cual debe incluir los siguientes datos:

Tabla 1. Formato de informe para prueba de carcinogénesis

INFORME DE PRUEBA

CARCINOGENESIS

DATOS DE LA SUSTANCIA EVALUADA		NOTAS:
Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas		
Datos de identificación		
Fuente de sustancia		
Número de lote		
Certificado de análisis químico		

VEHÍCULO (SI CORRESPONDE)		NOTAS:
Justificación de la elección del vehículo (si no es agua)		

ANIMALES DE PRUEBA		NOTAS:
Especie/cepa utilizada y justificación de la elección realizada		
Número, edad y sexo de los animales al inicio de la prueba		
Fuente, condiciones del espacio de alojamiento, dieta, etc.		
Pesos individuales de los animales al inicio de la prueba		



Tabla 1. Formato de informe para prueba de carcinogénesis (continuación)

CONDICIONES DE LA PRUEBA		NOTAS:
Justificación de la vía de administración y selección de la dosis		
Cuando corresponda, los métodos estadísticos utilizados para analizar los datos		
Detalles de la formulación de la sustancia problema/preparación de la dieta		
Datos analíticos sobre la concentración, estabilidad y homogeneidad alcanzadas del preparado		
Vía de administración y detalles de la administración de la sustancia problema para estudios de inhalación, ya sea sólo por la nariz o por todo el cuerpo		
Dosis reales (mg/kg de peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración de la sustancia problema en la dieta/agua potable (mg/kg o ppm) a la dosis real, si procede		
Detalles sobre la calidad de los alimentos y el agua		

2.5.2 Resultados

Al momento de reportar los resultados de las pruebas deben presentar datos resumidos en tablas y datos de animales individuales:



Tabla 2. Formato para resultados de la prueba de carcinogénesis

RESULTADOS

CARCINOGENESIS

DATOS DE SUPERVIVENCIA	
Peso corporal/cambios de peso corporal	
Consumo de alimentos, cálculos de eficiencia alimentaria, si se realizan, y consumo de agua, si es aplicable	
Datos toxicocinéticos si están disponibles	
Oftalmoscopía, hematología y química sanguínea (si están disponibles)	

HALLAZGOS GENERALES	
Signos de toxicidad	
Incidencia (y, si se califica, gravedad) de cualquier anomalía	
Naturaleza, gravedad y duración de los hallazgos observados (ya sean transitorios o permanentes)	

DATOS DE NECROPSIA	
Peso corporal al finalizar el estudio	
Pesos de órganos y sus proporciones, si corresponde; hallazgos de necropsia; Incidencia y gravedad de las anomalías	



Tabla 2. Formato para resultados de la prueba de carcinogénesis (continuación)

HISTOPATOLOGÍA	
Hallazgos histopatológicos no neoplásicos	
Hallazgos histopatológicos neoplásicos	
Correlación entre hallazgos macroscópicos y microscópicos	
Descripción detallada de todos los hallazgos histopatológicos relacionados con el tratamiento, incluidas las clasificaciones de gravedad	



3. PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

3.1 Objetivos

- Identificar las propiedades genotóxicas de una sustancia química y detectar los mecanismos genotóxicos relevantes en la tumorigénesis.
- Optimizar las pruebas de toxicología genética estándar para la predicción del riesgo de los efectos cancerígenos que tienen como base cambios en el material genético.
- Servir como referente en la interpretación de estudio de carcinogenicidad.

3.2 Consideraciones generales

El daño al ADN en forma de mutaciones génicas, daño cromosómico a mayor escala o recombinación genética, se considera esencial para los efectos hereditarios y cambios genéticos malignos. Los compuestos que resultan positivos en las pruebas que detectan este tipo de daños, tienen potencial carcinogénico y/o mutagénico humano. Las pruebas de genotoxicidad son útiles para la predicción de la carcinogenicidad.

Son establecidas pruebas *in vivo* e *in vitro* debido a que algunos agentes son mutagénicos *in vivo*, pero no *in vitro*, y porque es deseable incluir estudios que cuenten con factores como absorción, distribución, compuestos de forma sistemática y por ello no estar disponibles en tejidos objetivo.

En casos en que una modificación de la vía de administración no proporcione una exposición suficiente del tejido diana y no se disponga de un ensayo de genotoxicidad adecuado en el tejido más expuesto, podría ser conveniente basar la evaluación únicamente en ensayos *in vitro*.

Los resultados negativos en pruebas adecuadas (usualmente dos), con adecuada justificación para los puntos finales medidos y la demostración de la exposición a la sustancia, son generalmente considerados pruebas suficientes para demostrar la ausencia de riesgo genotóxico significante.

En casos donde el compuesto sea altamente tóxico a la bacteria, la prueba de mutación inversa bacteriana (prueba de Ames) debe ser llevada a cabo al igual que los compuestos citotóxicos son probados en células de mamíferos, ya que la mutagenicidad puede ocurrir a concentraciones más bajas y menos tóxicas.

Dado que la mayoría de los compuestos con alertas estructurales se definen en relación con la mutagenicidad bacteriana, resultados negativos en estas pruebas suelen considerarse garantía suficiente de ausencia de genotoxicidad. La elección de las pruebas o de las modificaciones del protocolo depende de la naturaleza química, de la reactividad y cualquier dato del metabolismo del compuesto.

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Pruebas *in vitro*

3.3.1.1 Ensayo de mutación bacteriana

Directriz de prueba 471 de la OCDE

La prueba de mutación inversa bacteriana utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* que requieren aminoácidos para detectar mutaciones puntuales, que implican la sustitución, adición o eliminación de uno o varios pares de ADN, el principio de la prueba es detectar mutaciones que revierten las mutaciones presentes en las cepas de prueba y restablecen la capacidad funcional de las bacterias para sintetizar un aminoácido esencial y se emplea comúnmente como detección inicial genotóxica, en particular de la actividad inductora de mutación puntual.

El nivel de dosis máximo recomendado es de 5000 µg/placa (5 µL/placa) cuando no esté limitado por solubilidad o citotoxicidad. Si no se observa citotoxicidad, se utilizará la dosis precipitante más baja como dosis máxima puntuable.

El conjunto recomendado de cepas será de cinco, incluyendo:

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Salmonella typhimurium TA1537 o TA97 o TA97a

Salmonella typhimurium TA102 o *Escherichia coli* WP2 uvrA o WP2 uvrA (pKM101)

Método de incorporación en placa:

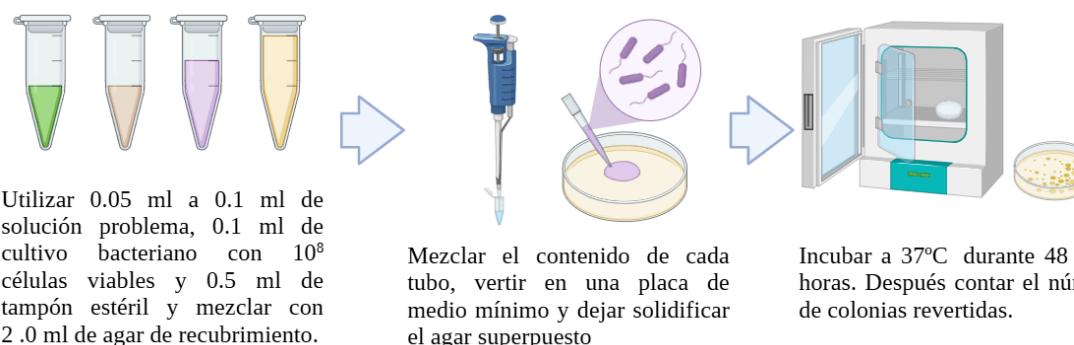


Figura 3. Esquema que representa el método de incorporación en placa.

Método de preincubación

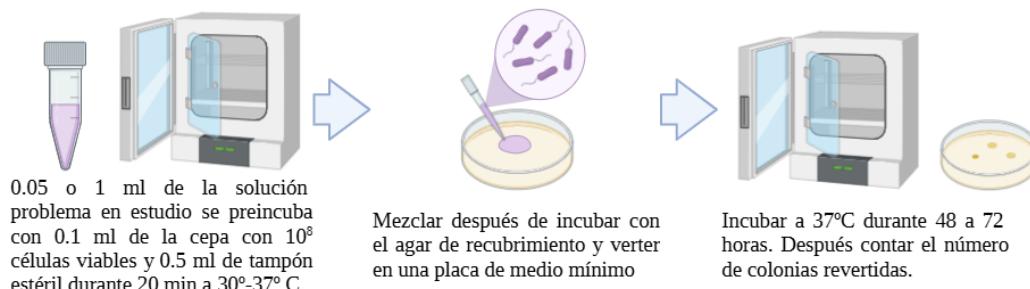


Figura 4. Esquema que representa el método de preincubación.

Es necesario incluir en cada ensayo controles simultáneos positivos y negativos específicos de la cepa con y sin activación metabólica, para ello deberá consultar la página 5 de la directriz No. 471 de la OCDE. La prueba con un sistema de activación metabólica exógeno requiere sustituir el tampón por la mezcla de activación metabólica.

Las sustancias sólidas de prueba deben disolverse o suspenderse en disolvente o vehículos apropiados antes del tratamiento de las bacterias. Las sustancias de prueba líquidas pueden agregarse directamente a los sistemas de prueba y/o diluirse antes del tratamiento.

3.3.1.2 Micronúcleos en células de mamíferos

Directriz de prueba 487 de la OCDE

La prueba de micronúcleos *in vitro* detecta los micronúcleos en el citoplasma de células en interfase que pueden originarse a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o de cromosomas completos que no pueden migrar a los polos durante la etapa de anafase de la división celular, por lo que proporciona una base integral para investigar el potencial de daño cromosómico *in vitro* al detectar tanto aneugenos como clastógenos en células que han experimentado una división celular durante la exposición a la sustancia evaluada.

Es importante demostrar que se ha producido proliferación celular tanto en los cultivos control como en los tratados puesto que la etapa más informativa para calificar los micronúcleos es en las células que han completado una mitosis durante o después del tratamiento con la sustancia en evaluación. En la figura 5 se indican los tipos de células que generalmente son utilizados para la realización de la prueba y la figura 6 representa el protocolo para la realización de la prueba de micronúcleos *in vitro*.

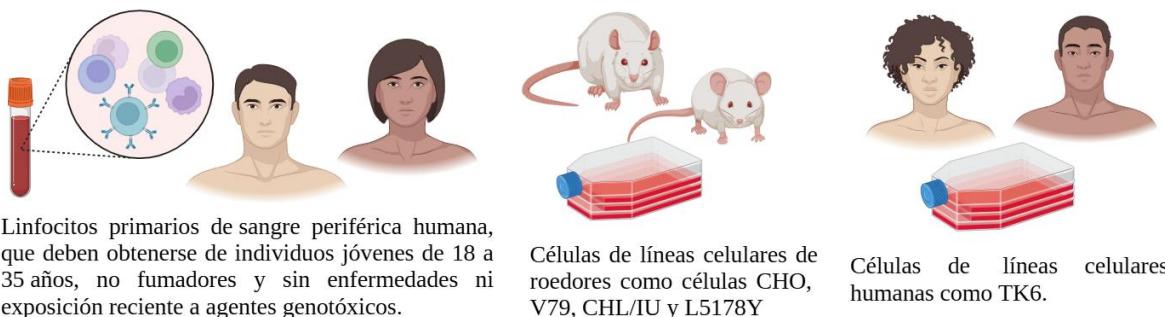
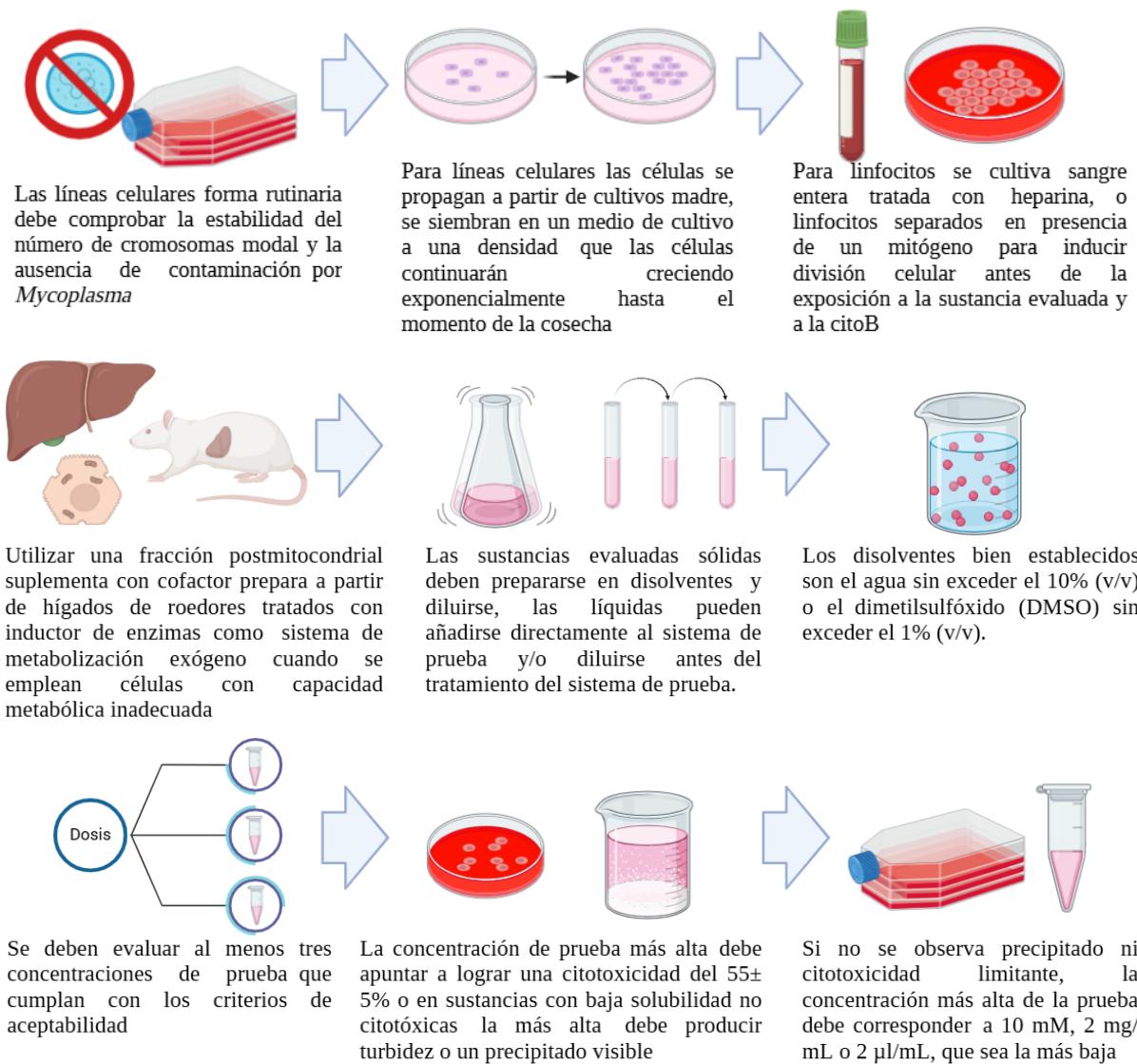
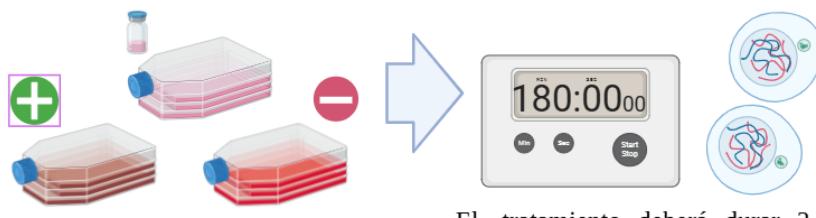


Figura 5. Células de mamíferos que pueden utilizarse para realizar la prueba de micronúcleos *in vitro*.





El protocolo del ensayo debe incluir la realización de ensayos con y sin activación metabólica, con controles positivos y negativos adecuados.

El tratamiento deberá durar 3 a 6 horas con un tiempo de muestreo de 1.5 a 2 ciclos celulares normales desde el inicio del tratamiento permitiendo que las células terminen la mitosis

Figura 6. Esquema que representa el protocolo de la prueba de micronúcleos *in vitro*.

3.3.2 Pruebas *in vivo*

3.3.2.1 Micronúcleos en eritrocitos de mamíferos

Directriz de prueba 474 de la OCDE

La prueba de micronúcleos *in vivo* en mamíferos detecta daños inducidos en los cromosomas o en el aparato mitótico de los eritroblastos por la sustancia en estudio, su relevancia yace en la evaluación de la genotoxicidad considerando los factores del metabolismo *in vivo*, la farmacocinética y los procesos de reparación del ADN activos. La prueba evalúa la formación de micronúcleos en eritrocitos de muestras de médula ósea o eritrocitos de sangre periférica de roedores, la figura 7 presenta el protocolo para la prueba.

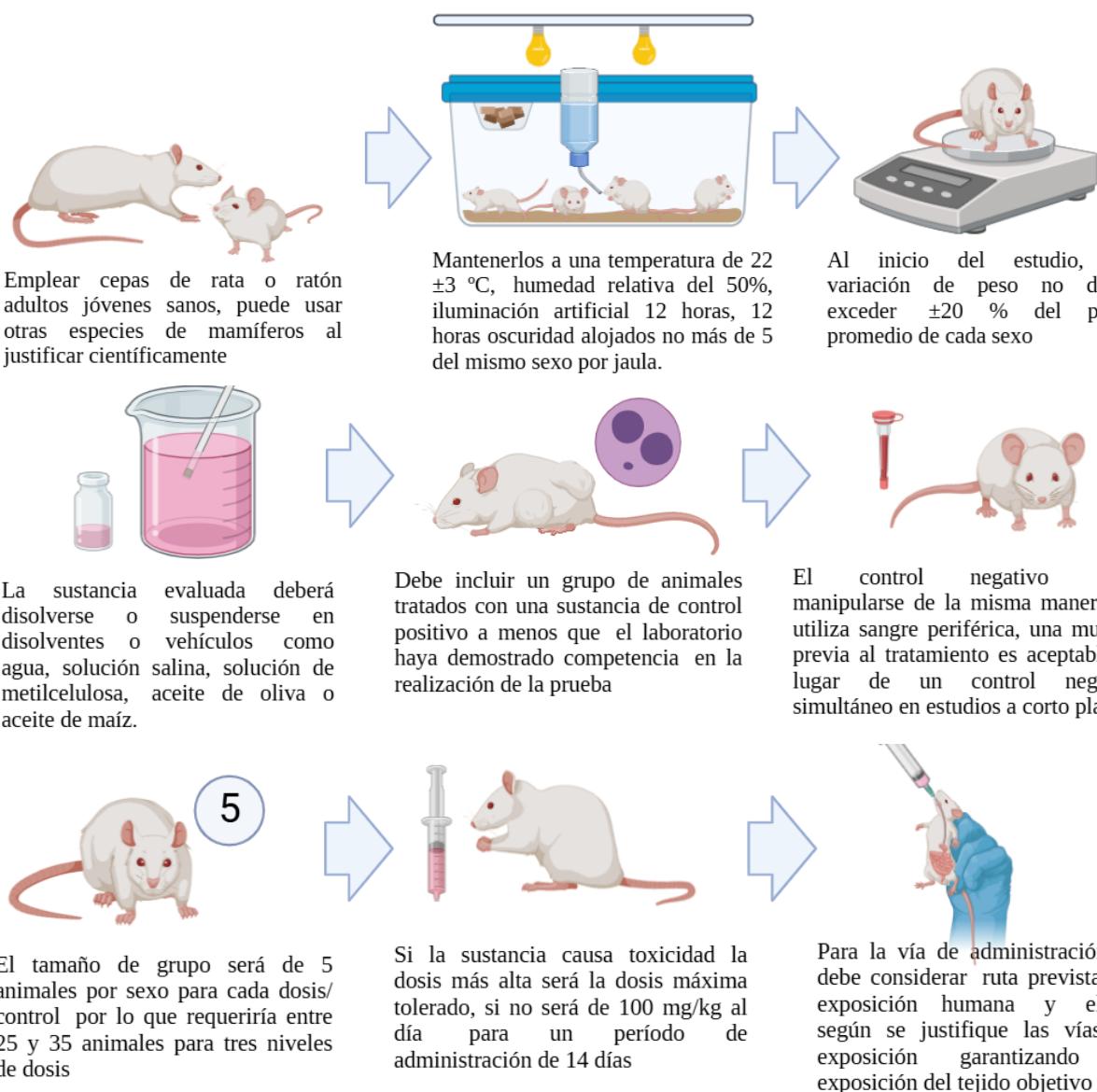
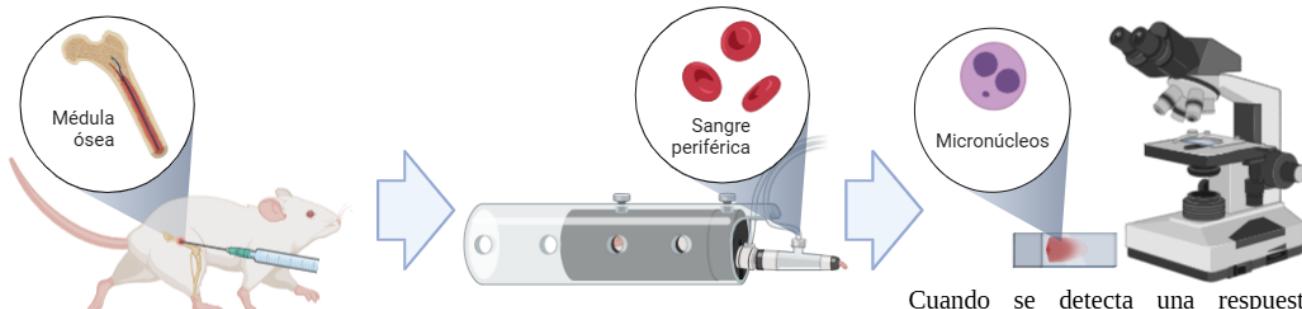


Figura 7. Esquema que representa el protocolo de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos *in vivo*.

La prueba de micronúcleos se puede realizar en ratas o ratones de tres maneras:

A) Los animales se tratan con la sustancia evaluada una sola vez:

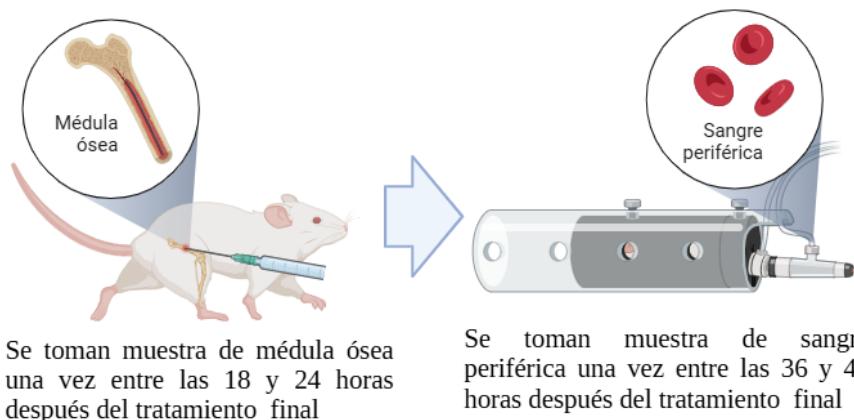


Se toman muestra de médula ósea al menos dos veces, entre las 24 y 48 horas después del tratamiento

Se toman muestra de sangre periférica al menos dos veces, entre las 36 y 72 horas después del tratamiento

Cuando se detecta una respuesta positiva en un momento de muestreo, no se requiere muestreo adicional a menos que se necesite información cuantitativa dosis-respuesta.

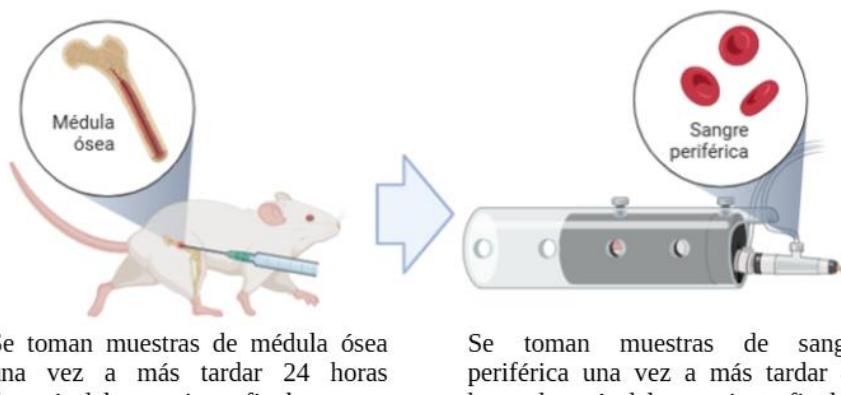
B) Se utilizan dos tratamientos diarios en un intervalo de 24 horas



Se toman muestra de médula ósea una vez entre las 18 y 24 horas después del tratamiento final

Se toman muestra de sangre periférica una vez entre las 36 y 48 horas después del tratamiento final

C) Se utilizan tres o más tratamientos en un intervalo de 24 horas



Se toman muestras de médula ósea una vez a más tardar 24 horas después del tratamiento final

Se toman muestras de sangre periférica una vez a más tardar 40 horas después del tratamiento final

Figura 8. Esquema que orienta para la toma de muestra según el número de tratamientos en 24 horas.

3.4 Evaluación del ensayo

3.4.1 Ensayo de mutación bacteriana

Existen diferentes criterios para determinar si un resultado es positivo. Se presenta en la figura 9 un esquema que refleja la evaluación del ensayo.

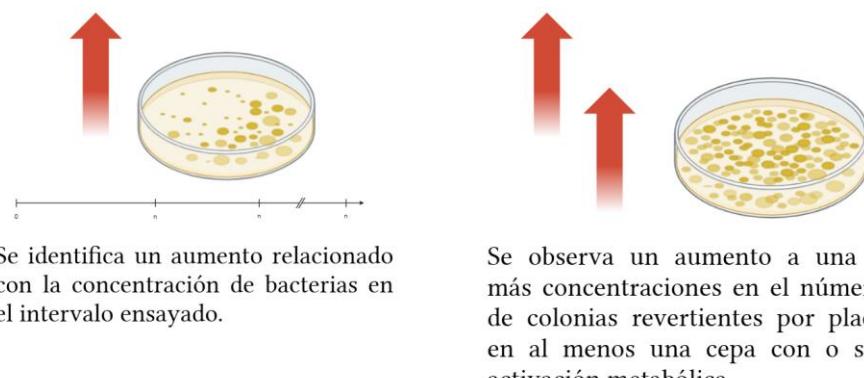


Figura 9. Esquema sobre interpretación de resultados positivos.

Una sustancia cuyos resultados no cumplen los criterios anteriores se considerará no mutagénica. La mayoría de estos experimentos arrojan resultados evidentemente positivos o negativos, rara vez el conjunto de datos impide emitir un juicio definitivo sobre la genotoxicidad de la sustancia. Los resultados siguen siendo cuestionables independientemente de las veces que se repita el experimento.

Los resultados positivos del ensayo indican que la sustancia induce mutaciones puntuales por sustitución de bases o cambios de marco en el genoma de *Salmonella typhimurium* y/o *Escherichia coli*. Los resultados negativos indican que, en las condiciones del ensayo, la sustancia evaluada no es mutagénica en las especies ensayadas. En la figura 10 se esquematiza una mutación del DNA.

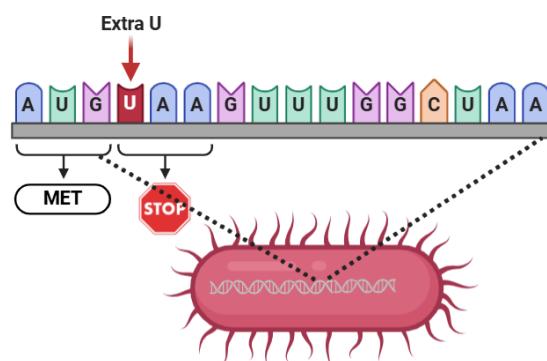


Figura 10. Esquema de mutación génica en bacterias.

3.4.2 Micronúcleos en células de mamíferos *in vitro*

Un resultado positivo *in vitro* debe evaluarse en función del peso de las pruebas, si las condiciones no se dan *in vivo*, el efecto sólo se produce en condiciones más tóxicas, indica una ausencia de potencial genotóxico. En resultados negativos, debe considerarse realizar pruebas adicionales la activación metabólica *in vitro* resulta inadecuada. En la figura 11 se visualiza el análisis a realizar para procesar las células de mamíferos de la prueba de micronúcleos *in vitro*.

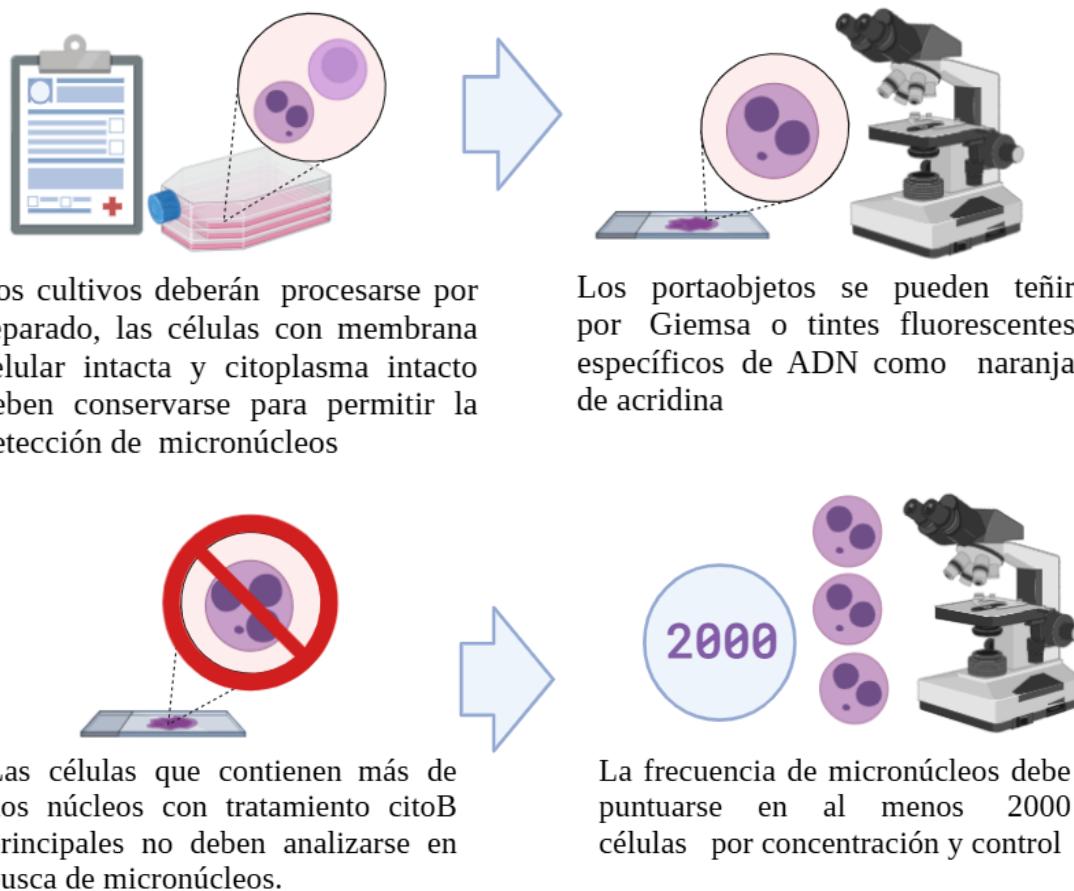


Figura 11. Esquema que señala el análisis que se debe realizar en la prueba de micronúcleos *in vitro*.

3.4.3 Micronúcleos en eritrocitos de mamíferos

Las pruebas *in vivo* permiten la absorción, distribución y excreción que es potencialmente relevante para el humano, por lo tanto, es importante tener en cuenta todos los hallazgos toxicológicos y hematológicos al evaluar los datos de genotoxicidad. La figura 12, presenta los factores a evaluar durante la prueba de micronúcleos *in vivo*.

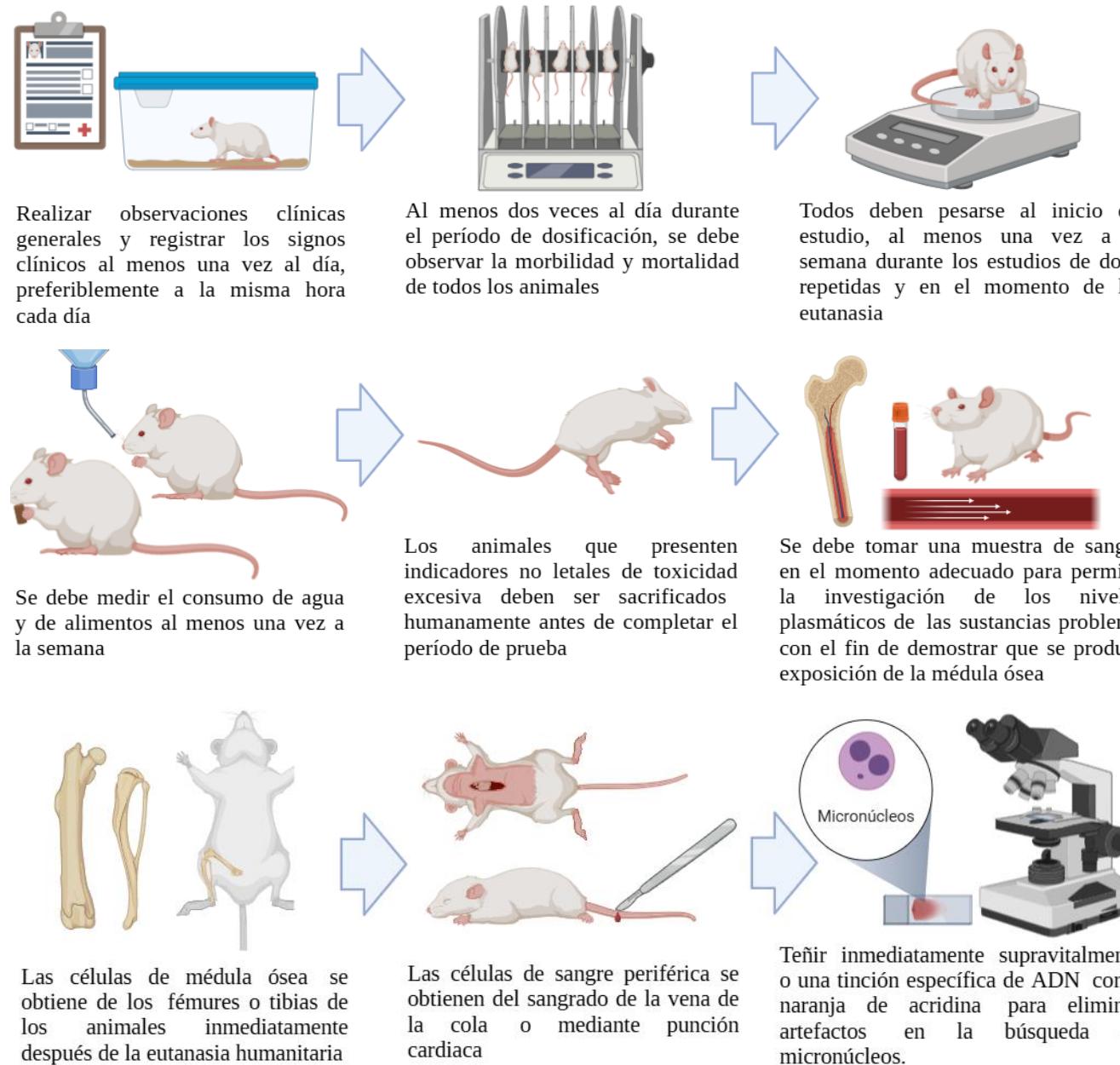


Figura 12. Esquema que señala la evaluación que se debe realizar en la prueba de micronúcleos *in vivo*.



3.5 Recolección y análisis de datos

3.5.1 Informe final

Enseguida se muestran formatos guía para realizar el informe, el cual debe incluir los siguientes datos:

Tabla 3. Formato de informe para *prueba in vitro*: “Ensayo de mutación bacteriana”

INFORME DE PRUEBA

GENOTOXICIDAD

ENSAYO DE MUTACIÓN BACTERIANA

DATOS DE LA SUSTANCIA EVALUADA		NOTAS:
Datos de identificación y número CAS, si se conocen		
Naturaleza física y pureza		
Propiedades fisicoquímicas relevantes para la realización del estudio		
Estabilidad de la sustancia problema, si se conoce		

VEHÍCULO (SI CORRESPONDE)		NOTAS:
Justificación de la elección del disolvente/vehículo		
Solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en disolvente/vehículo, si se conocen		

CEPAS		NOTAS:
Cepas utilizada		
Número de células por cultivo		
Características de la cepa		

Tabla 3. Formato de informe para prueba *in vitro*: “Ensayo de mutación bacteriana” (continuación)

CONDICIONES DE LA PRUEBA		NOTAS:
Cantidad de sustancia problema por placa (mg/placa o μ l/placa) con justificación para la selección de la dosis y número de placas por concentración		
Medios utilizados		
Tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad		
Procedimientos de tratamiento		

Tabla 4. Formato de informe para prueba *in vitro*: “Micronúcleos en células de mamíferos”

INFORME DE PRUEBA

GENOTOXICIDAD

MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

DATOS DE LA SUSTANCIA EVALUADA		NOTAS:
Fuente, número de lote, fecha límite de uso, si está disponible		
Estabilidad de la propia sustancia problema, si se conoce		
Reactividad de las sustancias problema con el disolvente/vehículo o el medio de cultivo celular		
Solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en disolvente, si se conocen		
Medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se añadió la sustancia problema, según corresponda		



Tabla 4. Formato de informe para prueba *in vitro*: “Micronúcleos en células de mamíferos” (continuación)

SUSTANCIAS MULTICONSTITUYENTES, UVBC Y MEZCLAS		NOTAS:
Caracterizado en la medida de lo posible por la identidad química (nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza,etc.), la ocurrencia cuantitativa y las propiedades fisicoquímicas relevantes de los constituyentes		
SOLVENTES		NOTAS:
Justificación de la elección del disolvente		
Porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final		
CÉLULAS		NOTAS:
Tipo y fuente de células utilizadas		
Idoneidad del tipo de célula utilizada		
Ausencia de micoplasma, en el caso de líneas celulares		
Para líneas celulares, información sobre la duración del ciclo celular o el índice de proliferación		
Dónde se utilizan linfocitos, sexo de los donantes de sangre, edad y cualquier información pertinente sobre el donante, sangre entera o linfocitos separados, mitógeno utilizado		
Tiempo del ciclo celular normal (control negativo)		
Número de pases, si están disponibles, para líneas celulares		
Métodos para el mantenimiento de cultivos celulares, para líneas celulares		

Tabla 4. Formato de informe para prueba *in vitro*: “Micronúcleos en células de mamíferos” (continuación)

CONDICIONES DE LA PRUEBA		NOTAS:
Identidad de la sustancia bloqueadora de la citocinesis (por ejemplo, citoB), si se utiliza, y su concentración y duración de la exposición celular		
Concentración de la sustancia problema expresada como concentración final del medio de cultivo (por ejemplo, µg o mg/ml, o mM de medio de cultivo)		
Justificación de la selección de concentraciones y del número de cultivos, incluidos datos de citotoxicidad y limitaciones de solubilidad		
Composición del medio, concentración de CO ₂ , si procede, nivel de humedad		
Concentración (y/o volumen) del disolvente y de la sustancia problema añadidos al cultivo		

MEDIO		NOTAS:
Temperatura y tiempo de incubación		
Duración del tratamiento		
Tiempo de cosecha después del tratamiento		
Densidad celular en el momento de la siembra, si procede		
Tipo y composición del sistema de activación metabólica (fuente, método de preparación de la mezcla, concentración o volumen de la mezcla y en el medio de cultivo final, controles de calidad (por ejemplo, actividad enzimática, esterilidad, capacidad metabólica)		



Tabla 4. Formato de informe para prueba *in vitro*: “Micronúcleos en células de mamíferos” (continuación)

Sustancias de control positivo y negativo, concentraciones finales, condiciones y duraciones del tratamiento y períodos de recuperación		NOTAS:
Métodos de preparación de portaobjetos y técnica de tinción utilizada		
Criterios para calificar las células micronucleadas (selección de células analizables e identificación de micronúcleos)		
Número de células analizadas		
Métodos para medir la citotoxicidad		
Cualquier información complementaria relevante sobre la citotoxicidad y el método utilizado		
Criterios para considerar los estudios como positivos, negativos o equívocos		
Método(s) de análisis estadístico utilizado		
Métodos, como el uso de anticuerpos cinetocoros o sondas específicas pancentroméricas, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados		
Métodos utilizados para determinar el pH, la osmolalidad y la precipitación		



Tabla 5. Formato de informe para prueba *in vivo*: “Micronúcleos de eritrocitos de mamíferos”

INFORME DE PRUEBA

GENOTOXICIDAD

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS DE ERITROCITOS DE MAMÍFEROS

DATOS DE LA SUSTANCIA EVALUADA		NOTAS:
Fuente, número de lote, fecha límite de uso, si está disponible		
Estabilidad de la sustancia problema, si se conoce		

SUSTANCIA MONOCONSTITUYENTE		NOTAS:
Aspecto físico, solubilidad en agua y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales		
Identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChi, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas, según corresponda y sea prácticamente factible, etc.		

SUSTANCIAS MULTICONSTITUYENTES, UVBC Y MEZCLAS		NOTAS:
Caracterizado en la medida de lo posible por la identidad química (nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChi, fórmula estructural, pureza,etc.), la ocurrencia cuantitativa y las propiedades fisicoquímicas relevantes de los constituyentes		



Tabla 5. Formato de informe para *prueba in vivo*: “Micronúcleos de eritrocitos de mamíferos” (continuación)

PREPARACIÓN DE LA SUSTANCIA EVALUADA		NOTAS:
Justificación de la elección del vehículo		
Solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en el disolvente/vehículo, si se conocen		
Determinaciones analíticas sobre formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, etc.)		
ANIMALES DE PRUEBA		NOTAS:
Especie/cepa utilizada y justificación de su uso		
Número, edad y sexo de los animales		
Fuente, condiciones de vivienda, dieta, etc.		
Método para identificar de forma única a los animales		
Para estudios de corta duración: peso individual de los animales al inicio y al final de la prueba; para estudios de más de una semana: peso corporal individual durante el estudio y consumo de alimentos. Debe incluirse el rango de peso corporal, la media y la desviación estándar de cada grupo.		
CONDICIONES DE PRUEBA		NOTAS:
Datos de control positivos y negativos (vehículo/disolvente)		
Datos del estudio de determinación de rangos, (si se realizó)		
Justificación de la selección del nivel de dosis		



Tabla 5. Formato de informe para *prueba in vivo*: “Micronúcleos de eritrocitos de mamíferos” (continuación)

Detalles de la preparación de la sustancia problema		NOTAS:
Detalles de la administración de la sustancia problema		
Justificación de la vía y duración de la administración		
Métodos para verificar que la(s) sustancia(s) de ensayo alcanzaron la circulación general o el tejido objetivo		
Dosis real (mg/kg de peso corporal/día) calculada a partir de la sustancia problema de prueba de la dieta/agua potable concentración (ppm) y consumo, si corresponde		
Método de eutanasia		
Descripción detallada de los programas de tratamiento y muestreo y justificación de las elecciones		
Procedimientos para aislar y conservar muestras		
Métodos de medición de la toxicidad		
Criterios para calificar eritrocitos inmaduros micronucleados		
Número de células analizadas por animal para determinar la frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados y para determinar la proporción de eritrocitos inmaduros a maduros		
Criterios de aceptabilidad del estudio		
Métodos, como el uso de anticuerpos anticinetocoros o sondas de ADN específicas de centrómero, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados		



3.5.2 Resultados

Al momento de reportar los resultados de las pruebas se deben presentar datos resumidos en tablas, a continuación se muestran formatos guía.

Tabla 6. Formato para resultados de la prueba *in vitro*: “Ensayo de mutación bacteriana”

RESULTADOS

GENOTOXICIDAD

ENSAYO DE MUTACIÓN BACTERIANA	
Signos de toxicidad	
Signos de precipitación	
Recuentos de placas individuales	
El número medio de colonias revertidas por placa y la desviación estándar	
Relación dosis-respuesta, cuando sea posible	
Análisis estadísticos, si los hubiere	
Datos de control negativos (disolvente/vehículo) y positivos simultáneos, con rangos, medias y desviaciones estándar	
Datos históricos de control negativos (disolvente/vehículo) y positivos, con, por ejemplo, rangos, medias y desviaciones estándar	

Tabla 7. Formato para resultados de la prueba *in vitro*: “Micronúcleos en células de mamíferos”

RESULTADOS

GENOTOXICIDAD

MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS	
Definición de células aceptables para el análisis	
En ausencia de cito B, el número de células tratadas y el número de células cosechadas para cada cultivo en caso de líneas celulares	
Parámetros para estimar la citotoxicidad, p.ej. CBPI o RI en el caso del método de bloque de citocinesis; RICC o RPD cuando no se utilizan métodos de bloque de citocinesis; otras observaciones, si las hay (por ejemplo, confluencia celular, apoptosis, necrosis, conteo de metafase, frecuencia de células binucleadas)	
Signos de precipitación y tiempo de determinación	
Datos sobre pH y la osmolaridad del medio de tratamiento si se determinan	
Distribución de células mono, bi y multinucleadas si se utiliza un método de bloqueo de citocinesis.	
Número de células con micronúcleos dados separado para cada cultivo tratado y de control, y definición de si a partir de células binucleadas o mononucleadas, cuando corresponda	
Relación concentración-respuesta, siempre que sea posible	
Datos de control negativos (solvente) y positivos concurrentes (concentraciones y datos históricos negativos (solvente) y de control positivo, con rangos, medias y desviación estándar y límites de control del 95% para la distribución, así como el número de datos	



Tabla 7. Formato para resultados de la prueba *in vivo*: “Micronúcleos de eritrocitos de mamíferos”

RESULTADOS

GENOTOXICIDAD

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS DE ERITROCITOS DE MAMÍFEROS	
Estado del animal antes y durante el período de prueba, incluidos los signos de toxicidad	
Proporción de eritrocitos inmaduros entre el total de eritrocitos	
Número de eritrocitos inmaduros micronucleados, indicado por separado para cada animal	
Media ± desviación estándar de eritrocitos inmaduros micronucleados por grupo	
Relación dosis-respuesta, cuando sea posible; análisis estadísticos y métodos aplicados	
Datos de control positivos y negativos simultáneos con rangos, medias y desviaciones estándar	
Datos históricos de control negativo y positivo con rangos, medias, desviaciones estándar y límites de control del 95 % para la distribución, así como el período de tiempo cubierto y el número de puntos de datos	
Datos de caracterización que indiquen si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados	
Criterios para una respuesta positiva o negativa que se cumplen	



4. Consideraciones éticas

En los estudios que implican dosis repetidas, cuando un animal muestra signos clínicos progresivos que conducen a un mayor deterioro de su estado, debe tomarse una decisión informada sobre si sacrificar o no humanitariamente al animal. La decisión debe incluir la consideración del valor de la información que se obtendrá del mantenimiento continuado de ese animal en estudio en relación con su estado general. Si se decide dejar al animal en estudio, se deberá aumentar la frecuencia de las observaciones, según sea necesario. También puede ser posible, sin afectar negativamente a la finalidad del ensayo, interrumpir temporalmente la dosificación si con ello se alivia el dolor o la angustia, o reducir la dosis del ensayo.

5. Glosario

Aberración cromosómica: Cualquier duplicación, delección o reordenación del contenido cromosómico diploide de un organismo.

Aducto de ADN: Producto de la unión covalente de una sustancia química al ADN.

Aneugenos: Son sustancias que causan aneuploidía, una condición en el número de cromosomas en una célula es anormal por la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas.

Aneuploidía: Situación en la que el número de cromosomas no es un múltiplo exacto del número haploide.

Carcinogenicidad: Proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas.

Centrómero: Región cromosómica heterocromática especializada por la que permanecen unidas las cromátidas hermanas después de la replicación y el lugar donde las fibras del huso se enganchan durante la división celular. La localización del centrómero determina la forma del cromosoma durante la anafase de la división celular.

Citotoxicidad: Capacidad de una sustancia o agente para dañar o destruir células vivas. Esto puede alterar las funciones celulares, impedir el crecimiento o causar la muerte celular.

Clastógenos: Un agente que produce el rompimiento estructural de cromosomas, usualmente es detectable por microscopía de campo claro.

Delección: Mutación cromosómica que implica la pérdida de material cromosómico.

Eficacia de la clonación: La eficiencia de las células individuales para formar clones. Suele medirse tras sembrar un número reducido de células en un medio adecuado.

Epigenética: El estudio de las modificaciones en función de las modificaciones en la función génica de un organismo que no son atribuibles a alteraciones en la secuencia nucleotídica del ADN del organismo.



Eritrocito policromático: Eritrocito inmaduro en un estadio intermedio de desarrollo que aún contiene ribosomas, puede distinguirse de los eritrocitos normocromáticos maduros mediante tinciones selectivas para el ARN.

Genotoxicidad: Cualquier cambio deletéreo en el material genético, independientemente del mecanismo por el que se induce el cambio.

In vitro: Literalmente, en vidrio; que ocurre fuera del organismo vivo; que ocurre en un entorno artificial.

In vivo: Literalmente, en vivo: que ocurre dentro del cuerpo del organismo vivo.

Micronúcleos: Partícula en una célula que contiene DNA nuclear; puede contener uno o varios cromosomas enteros o una parte o partes céntricas o acéntricas rotas de los cromosomas.

Mutación puntual: Mutación que se puede cartografiar en un solo locus. A nivel molecular, una mutación que resulta de la sustitución de un nucleótido por otro.

Recombinación: Proceso que da lugar a la formación de nuevas combinaciones alélicas en el cromosoma.

6. Referencias bibliográficas

OECD. (2018). Test No. 451: Carcinogenicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-451-carcinogenicity-studies_9789264071186-en

OECD. (2016). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en

OECD. (2020). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en

OECD. (2016). Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264264762-en