

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

7617 *ORDEN de 5 de abril de 2001 por la que se modifican los anexos I, IV, V, VI y IX del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.*

El Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, se aprobó por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo. Esta disposición se dictó de acuerdo con las normas comunitarias reguladoras de la materia constituidas fundamentalmente por la Directiva del Consejo 67/548/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, así como por sus posteriores modificaciones y adaptaciones al progreso técnico.

Mediante las Órdenes de 13 de septiembre de 1995, de 21 de febrero de 1997, de 30 de junio de 1998, de 11 de septiembre de 1998, de 16 de julio de 1999 y de 5 de octubre de 2000, se han introducido diversas modificaciones en los anexos I, III, IV, V y VI del citado Reglamento, con el objeto de incorporar a nuestro Derecho Interno las Directivas de la Comisión 93/101/CEE, 94/69/CE, 96/54/CE, 97/69/CE, 98/73/CE y 98/98/CE, respectivamente, que adaptan al progreso técnico la Directiva marco 67/548/CEE del Consejo, citada anteriormente, modificando sus anexos.

Con posterioridad se han publicado la Directiva 2000/32/CE de la Comisión, de 19 de mayo de 2000, por la que se adapta por vigésima sexta 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, la Directiva 2000/33/CE de la Comisión, de 25 de abril de 2000, por la que se adapta por vigésima séptima vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE ya citada y la Decisión de la Comisión de 19 de mayo de 2000 que corrige la Directiva 98/98/CE por la que se adapta por vigésima quinta vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE mencionada anteriormente, por lo que se hace necesario proceder a su transposición al ordenamiento jurídico español, mediante la presente Orden, que se dicta de acuerdo con la habilitación prevista en la disposición final primera del Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

En su virtud, oídos los sectores afectados y a propuesta de las Ministras de Sanidad y Consumo y de Ciencia y Tecnología, dispongo:

Artículo 1.

El anexo I del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, queda modificado en la siguiente forma:

- En la tabla A se sustituirá el símbolo químico A de Argón (número atómico 18) por el símbolo Ar.
- Se sustituyen las correspondientes entradas por las que aparecen en el anexo A-1 de la presente Orden.
- Se adicionan las entradas que aparecen recogidas en el anexo A-2 de la presente Orden.

Artículo 2.

El consejo de prudencia (frase S) combinada S 29/56 del anexo IV del Reglamento citado, se sustituirá por la siguiente redacción:

S29/56: «No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.»

Artículo 3.

La parte B del anexo V del Reglamento citado se modificará de la manera siguiente:

- El capítulo B.10 (Mutagenicidad-ensayo de aberraciones cromosómicas in vitro en mamíferos) se sustituirá por el texto del anexo B-1 de la presente Orden.
- El capítulo B.11 (Mutagenicidad-ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo en médula ósea de mamíferos), se sustituirá por el texto del anexo B-2 de la presente Orden.
- El capítulo B.12 (Mutagenicidad-ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero in vivo), se sustituirá por el texto del anexo B-3 de la presente Orden.
- Los capítulos B.13 y B.14 (Mutagenicidad-ensayo de mutación inversa en bacterias), se sustituirán por el texto del anexo B-4 de la presente Orden.
- El capítulo B.17 (Mutagenicidad-ensayo de mutación génica de células de mamífero in vitro), se sustituirá por el texto del anexo B-5 de la presente Orden.
- El capítulo B.23 (Ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero), se sustituirá por el texto del anexo B-6 de la presente Orden. El título del capítulo B.23 que figura en la nota explicativa se modificará en consecuencia.
- Se añadirá el texto del anexo B-7 [B.39. Ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero in vivo] de la presente Orden.
- Se añadirán los textos de los anexos B-8 (B.40 Corrosión cutánea) y B-9 (B.41 Fototoxicidad. Ensayo de fototoxicidad in vitro 3T3 NRU) de la presente Orden.

Artículo 4.

Se suprimirá el cuarto guión de la introducción general de la parte C del anexo V.

Artículo 5.

El anexo IX del Reglamento citado se modificará con arreglo al anexo C de la presente Orden.

Artículo 6.

El anexo B de la Orden del Ministerio de la Presidencia de 5 de octubre de 2000 por la que se modifican los anexos I, III, IV y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, queda sustituido por el anexo D de la presente Orden. Las modificaciones que establece dicho anexo D se introducirán en el anexo VI (criterios generales de clasificación y etiquetado de sustancias y preparados peligrosos) del Reglamento mencionado en este artículo.

Disposición derogatoria única.

Queda derogado el artículo 4 de la Orden del Ministerio de la Presidencia de 5 de octubre de 2000 por

la que se modifican los anexos I, III, IV y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

Disposición final primera.

Los artículos 1, 2, 4, 5 y 6, y los apartados a), b), c), d), e), f) y g) del artículo 3 de la presente Orden entrarán en vigor a los seis meses de la publicación de esta Orden en el «Boletín Oficial del Estado».

Disposición final segunda.

El apartado h) del artículo 3 de la presente Orden entrará en vigor a los nueve meses de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 5 de abril de 2001.

LUCAS GIMÉNEZ

Excmas. Sras. Ministras de Sanidad y Consumo y de Ciencia y Tecnología.

ANEXO A-1

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
006-011-00-7	carbaril (ISO) carbarilo (DCI) metilcarbamato de 1-naftilo		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metam-sodio (ISO) N-metilditiocarbamato de sodio		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO) N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetilurea		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoxur (ISO) metilcarbamato de 2-isopropoxifenilo		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldicarb (ISO) 2-metil-2-(metilitio)propional- dehído-O-(metilcarbamoil)oxima		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminocarb (ISO) metilcarbamato de 4-dimetilamino-m-tolilo		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	dialato (ISO) diisopropiltiocarbamato de S-2,3-dicloroalilo		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barban (ISO) 3-clorofenilcarbamato de 4-clorobut-2-inilo		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	mercaptopdimetur (ISO) metiocarb metilcarbamato de 4-metiltio-3,5-xililo		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proxan-sodio (ISO) ditiocarbamato de O-isopropilo y de sodio		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
006-026-00-9	carbofuran (ISO) metilcarbamat de 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilo		216-353-0	1563-66-2	T+: R26/28 N: R50-53	T+: N R: 26/28-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobuton (ISO) carbonato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo y de isopropilo		213-546-1	973-21-7	T: R25 N: R50-53	T: N R: 25-50/53 S: (1/2-37-45-60-61		
006-029-00-5	dioxacarb (ISO) metilcarbamat de 2-(1,3-dioxalano-2-il)fenilo		230-253-4	6988-21-2	T: R25 N: R51-53	T: N R: 25-51/53 S: (1/2-37-45-61		
006-033-00-7	metoxuron (ISO) N'-(3-cloro-4-metoxifenil)-N,N-dimetilurea		243-433-2	19937-59-8	N: R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulato (ISO) butil (etil)tiocarbamat de S-propilo		214-215-4	1114-71-2	Xn: R22 N: R51-53	Xn: N R: 22-51/53 S: (2-23-61		
006-035-00-8	pirimicarb (ISO) N,N-dimetilcarbamat de 2-dimetilamino-5,6,4-dimetilpirimidinilo		245-430-1	23103-98-2	T: R25 N: R50-53	T: N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promecarb (ISO) metilcarbamat de 5-isopropil-3-tolilo metilcarbamat de 5-metil-m-cumenilo		220-113-0	2631-37-0	T: R25 N: R50-53	T: N R: 25-50/53 S: (1/2-24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfalato (ISO) dietilditiocarbamat de 2-cloroalilo	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn: R22 N: R50-53	T: N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	trialato (ISO) diisopropiltiocarbamat de S-2,3,3-tricloroalilo		218-962-7	2303-17-5	Xn: R22-48/22 R43 N: R50-53	Xn: N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-24-37-60-61		
006-042-00-6	monuron (ISO) 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetilurea		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn: R22 N: R50-53	Xn: N R: 22-40-50/53 S: (2-36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA tricloroacetato de 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetiluronio		—	140-41-0	Xi: R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N: R50-53	Xn: N R: 36/38-40-50/53 S: (2-36/37-60-61		3

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
006-045-00-2	metomil (ISO) metilcarbamato de metilto-1-etilidenamino		240-815-0	16752-77-5	T+: R28 N: R50-53	T+: N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiocarb (ISO) metilcarbamato de 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ilo		245-216-8	22781-23-3	T: R23/25 Xn: R21 N: R50-53	T: N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufencarb metilcarbamato de 3-(pent-2-il)fenilo- metilcarbamato de 3-(pent-3-il)fenilo (3:1), conteniendo 35 % de una mezcla de isómeros 2- y 4		—	8065-36-9	T: R24/25 N: R50-53	T: N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	etiofencarb (ISO) metilcarbamato de 2-etiltiometilfenilo		249-981-9	29973-13-5	Xn: R22 N: R50-53	Xn: N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	fenuron-tricloroacetato tricloroacetato de 1,1-dimetilfeniluronio		—	4482-55-7	Xi: R38 N: R50-53	Xi: N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoproc carb (ISO) metilcarbamato de o-cumenilo		220-114-6	2631-40-5	Xn: R22 N: R50-53	Xn: N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	mexacarbato (ISO) metilcarbamato de 4-dimetilamino-3,5-xililo		206-249-3	315-18-4	T+: R28 Xn: R21 N: R50-53	T+: N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapyrin (ISO) 2-cloro-6-triclorometilpiridina		217-682-2	1929-82-4	Xn: R22 N: R51-53	Xn: N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	oxicarboxin (ISO) 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilida 4,4-dioxido		226-066-2	5259-88-1	Xn: R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	tiofanato-metil (ISO)		245-740-7	23564-05-8	Muta- Cat. 3; R40 N: R50-53	Xn: N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furnecyclo N-ciclohexil-2,5-dimetil-N-metoxi-3-furamida		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N: R50-53	Xn: N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
006-088-00-7	benfurcarb (ISO)		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-dimetilhidrazina	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-dimetilhidrazina	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	fluoruro de hidrógeno ... % ácido fluorhídrico ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-7/9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinfos-metil (ISO) ditiofosfato de O,O-dimetilo y de 4-oxobenzotriazin-3-ilmetilo		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fention (ISO) tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-(4-metiltio-m-tolilo)		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinfos-etil (ISO) ditiofosfato de O,O-dietilo y 4-oxobenzotriazin-3-ilmetilo		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazofos (ISO) tiofosfato de O,O-dietilo y de O-1-fenil-1,2,4-triazol-3-ilo		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
016-013-00-X	dicloruro de azufre		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	5

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
016-014-00-5	tetracloruro de azufre		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C: N R: 14-34-50 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	sulfato de dimetilo	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+: R26 T: R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0,1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	dimexano (ISO) disulfuro de bis(metoxi-tiocarbonilo)		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N: R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
016-071-00-6	3-amino-6,13-dicloro-10-((3-(4-cloro-6-(2-sulfofenilamino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)propil)amino)-4,1,1-trifenoxidioxazindisulfonato de trisodio		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
022-001-00-5	tetracloruro de titanio		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2)-7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	dimetilcinc [1] dietilcinc [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2)-16-43-45-60-61		
050-002-00-0	cihexatin (ISO) hidróxido de tri(ciclohexil)estaño		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N: R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-13-60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
050-012-00-5	tetraciclohexilstanano [1] clorotriciclohexilstanano [2] butiltriciclohexilstanano [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	óxido de fenbutatina (ISO) óxido de bis(tris(2-fenil-2-metilpropil)estaño)		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	carillo de sulfocromato de plomo [Esta sustancia está identificada en el Colour Index por el Colour Index Constitution Number C.I. 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	rojo de cromato molibdato sulfato de plomo [Esta sustancia está identificada en el Colour Index por el Colour Index Constitution Number C.I. 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	cumeno [1] propilbenceno [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo[a]pireno benzo[de]fisiseno		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benzo[e]acefenantileno		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diclorobenceno p-diclorobenceno		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-yodopropeno yoduro de alilo		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		7

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
603-076-00-9	but-2-ino-1,4-diol 2-butino-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2)-26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	exo-1-metil-4-(1-metiletil)-7-oxabicyclo [2.2.1]heptan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2)-26		
603-093-00-1	exo-(+/-)-1-metil-4-(1-metiletil)-2-[(2- metilfenil)metoxi]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2)-23-61		
603-097-00-3	1,1',1"-nitritolpropan-2-ol		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2)-26-61		
603-117-00-0	propan-2-ol alcohol isopropílico		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2)-7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	bifenil-2-ol 2-hidroxibifenilo		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2)-22-61		
604-021-00-1	óxido de sodio y de bifetil-2-ilo		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2)-22-26-61		
604-024-00-8	4,4':isobutiletilendifenol		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]- 2-nitrobenzoico [1] 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]- 2-nitrobenzoato de sodio [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2)-24-39-60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
604-043-00-1	monobenzona		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mequinol		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glioxal ... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%; Xn; R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10%; Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindona (ISO) 2-pivaloil-indano-1,3-diona		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	diclona (ISO) 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	clordecon (ISO) decaloropentaciclo [5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}] decan-4-ona		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metribuzin (ISO) 4-amino-6-terc-butil-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	cloridazon (ISO) 5-amino-4-cloro-2-fenilpiridazin-3-ona pirazona		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	chinometionato (ISO) 6-metil-1,3-ditio(4,5-b)quinoxalin-2-ona		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimefon (ISO) 1-(4-clorotenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butanona		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		9

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
606-044-00-2	2,4,6-trimetilbenzofenona		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) ácido 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoico		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	cumacolor (ISO) 3-(1-(4-clorofenil)-3-oxobutil)-4-hidroxicumarina		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	cumafuril (ISO) 3-[1-(2-furil)-3-oxo-butil]-4-hidroxicumarin		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	celevano (ISO) 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decacoloro-4-hidroxipentacilo(5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}) dec-4-il)-4-oxovalerato deetilo		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	1,2-anhídrido del ácido benceno-1,2,4-tricarboxílico		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	ácido valérico		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) ácido 2,3,6-triclorobenzoico		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benazolina (ISO) ácido 4-cloro-2-oxobenzotiazolin-3-ilacético		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	clorofenson (ISO) 4-clorobenzenosulfonato de 4-clorofenilo		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	sal de sodio del ácido cloroacético cloroacetato de sodio		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		10

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-159-00-0	clorobencilato (ISO) 4,4'-diclorobencilato de etilo		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-176-00-3	Mezcla de: α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil- ω -hidroxipoli(oxi-etileno): α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil- ω -3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propioniloxipoli(oxi-etileno)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	N-carboxilatoetil-N-octadec-9-enilmaleamato de hidrógeno y sodio		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Mezcla de: O,O-di(1-metiletil)trinitio-bis-tioformato;O,O-di(1-metiletil)tetratio-bis-tioformato;O,O-di(1-metiletil)pentatio-bis-tioformato		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	3,3-bis[(1,1-dimetilpropil)peroxi]butirato de etilo		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-[4-(7-fenil-2,6-dihidro-2,6-dioxo-1,5-dioxain-dacen-3-il)fenoxi]acetato de 2-etoxietilo		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	3,6-dicloro-o-anisato de sodio [1] ácido 3,6-dicloro-o-anísico, compuesto con 2,2'-iminodietanol (1:1) [2] ácido 3,6-dicloro-o-anísico, compuesto con 2-aminoetanol (1:1) [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]		1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	naptalam-sodio		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		11

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-249-00-X	diacrilato de (1-metil-1,2-etanodiol)bis(oxi(metil-2,1-etanodiol)		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10%: Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%: Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-cihalotrin (ISO)		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroxipir (ISO)		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	acrilonitrilo	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20%: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%: T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%: T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%: T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%: T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%: T; R45	
608-016-00-5	1,4-diciano-2,3,5,6-tetra-cloro-benceno		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterb (ISO) 2-ter-butil-4,6-dinitrofenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofen (ISO) 2,4-diclorofenil 4-nitrofenil éter	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	tecnaceno (ISO) 1,2,4,5-tetracloro-3-nitrobenceno		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
611-008-00-4	4-aminoazobenceno		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	1-hidroxi-7-(3-sulfonatoanilino)-2-(3-metil-4-(2-metoxi-4-(3-sulfonatofenilazo)fenilazo)naftaleno-3-sulfonato de trilitio		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)/35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-iminociclohexa-2,5-dienilidenometileno)dianilina, clorhidrato		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoxianilina o-anisidina	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	bencidina 4,4'-diaminobifenilo	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%; T; R45-22 0,01% ≤ C < 25%; T; R45	
612-051-00-1	4,4-metilendianilina 4,4'-diaminodifenilmetano	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ 21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	sales de 4,4'-bi-o-toluidina	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metil-m-fenilendiamina	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-piperazin-1-iletilamina		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)/26-36/37/39-45-61		1B

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
612-111-00-7	2-metil- <i>m</i> -fenilendiamina		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2)-24-36/37-61		
612-125-00-3	2-metil- <i>p</i> -fenilendiamina		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2)-24-37-45-61		
612-144-00-7	flumetralina (ISO)		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotolueno	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamcuat (ISO) ion-1,1'-bis(3,5-dimetilmorfolinocarbonil- metil)-4,4'-bipiridilio		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-031-00-5	sinclóseno		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2)-8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-fenil-1,3,5-triazina-2,4-diildiamina		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-042-00-5	1-[2-(aliloxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil]- 1 <i>H</i> -imidazol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
613-043-00-0	hidrogenosulfato de 1-[2-(aliloxi)etil-2- (2,4-diclorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol] [1] hidrogenosulfato de (±)-1-[2-(aliloxi)etil-2- (2,4-diclorofenil)]-1 <i>H</i> -imidazol [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		1/4

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
613-066-00-6	terbumeton (ISO) 2-terc-butilamino-4-etilamino-6-methoxi-1,3,5-triazina		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-091-00-2	dicloruro de morfamcuat [1] sulfato de morfamcuat [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-098-00-0	N-(n-octil)-2-pirrolidinona		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	hexaconazol (ISO)		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	pirroquilona (ISO)		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	miclobutanilo (ISO)		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-137-00-1	metabenzotiazuron (ISO)		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metsulfuron metil metil-2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilcarbamoilsulfoni)benzoato		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nicotina (ISO)		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
614-006-00-1	brucina		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
614-007-00-7	sulfato de brucina [1] nitrato de brucina [2] estricnidina-10-ona, 2,3-dimetoxi-, mono((R)-1-metilheptil-1,2-bencenodicarboxilato) [3] estricnidin-10-ona, 2,3-dimetoxi-, compuesto con (S)-mono(1-metilheptil-1,2-bencenodicarboxilato) (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	diisocianato de 2-metil-m-fenileno [1] diisocianato de 4-metil-m-fenileno [2] diisocianato de m-tolilideno [3] 2,6-diisocianato de tolueno [1] 2,4-diisocianato-tolueno [2]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 20%; T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%; T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%; T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%; Xn; R20-42	2
616-010-00-9	tosilcloramida sódica		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)/7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	piracarbolid (ISO)		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	2-ciano-N-[(etilamino)carbonil]-2-(metoxiimino)acetamida		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	hidroperóxido de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26 -36/37/39-45-60-61	C ≥ 25%; C; R22-34 10% ≤ C < 25%; C; R34 5% ≤ C < 10%; Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	peróxido de bis(α,α-dimetilbencilo)		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	peróxido de dibenzoilo		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	clordimeform (ISO) N ² -(4-cloro-o-tolil)-N ¹ ,N ¹ -dimetilformamidina		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
650-008-00-9	drazoxolon (ISO) 4-(2-clorofenilhidrazon)-3-metil-5-isoxazolona		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)-22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	clorodimeform, clorhidrato N'-(4-cloro-o-tolil)-N,N-dimetilformamida, monoclorhidrato		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)-22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalerato (ISO) (S)- α -ciano-3-fenoxibencil-(S)-2-(4-clorofenil)- 3-metilo, butirato de		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2)-24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuron (ISO) 1-[2-(2-cloroetoxi)fenilsulfonil]-3-(4-metoxi- 6-metil-1,3,5-triazín-2-il) urea		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ANEXO A-2

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
006-090-00-8	fenilcarbamato de 2-(3-iodoprop-2-in-1-ilo)etilo		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	mezcla de: 1,3-dihex-5-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloxano; 1,3-dihex-n-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloxano		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	dihidrato del P,P'-(1-hidroxietileno)bis(hidrógeno fosfonato) de calcio		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	mezcla de: bishexafluorofosfato de tiorbis(4,1-fenileno)-S,S',S'-tetrafenildisulfonio; hexafluorofosfato de difenil(4-feniltiofenil)sulfonio		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-terc-butil-4-metilfenoxi)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difosfaespiro[5,5]undecano		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	ácido 3-(hidroxifenilfosfinil)propanoico		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	benceno, C ₁₀₋₁₃ -alquil derivados		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenilbut-1-eno		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	difenil éter, derivado pentabromado		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dicloro-1-fluoroetano		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenilmetoxi)naftaleno		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
603-129-00-6	1-terc-butoxiopropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	mezcla de isómeros de: α -(dimetil)bifenil)- ω -hidroxipoli(oxietileno)		406-325-8	—	Xn: R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	mezcla (3:1) de: 1-desoxi-1-[metil-(1-oxododecil)amino]-D-glucitol; 1-desoxi-1-[metil-(1-oxotetradecil)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-hidroximetil-9-metil-6-(1-metiletil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decano		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	mezcla de: 3-[(4-amino-2-cloro-5-nitrofenil)amino]propan-1,2-diol; 3'-(2-cloro-5-nitro-1,4-fenilendiimino)bis(propan-1,2-diol)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	mezcla de difenil, dodecil y/o tetradecil éteres sustituidos. La sustancia se produce mediante la reacción de Friedel Craft. El catalizador se separa del producto de reacción. El difenil éter está sustituido con de 1 a 10 grupos alquilo. Los grupos alquilo se enlazan al azar entre C1 y C6. Se usan C12 y C14 lineales en proporción 50/50.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2''-nitrotrisis(etanolato))-1-N,O]bis[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-titanio		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-[(4-(bis(2-hidroxietil)amino)-2-nitrofenil)amino]-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	mezcla de: 1-desoxi-1-[metil-(1-oxohexadecil)amino]-D-glucitol; 1-desoxi-1-[metil-(1-oxooctadecil)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetil-3-hidroxipropil)tolueno; (alt.): 2,2-dimetil-3-(3-metilfenil)propanol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas ex- plicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas ex- plicativas sobre los preparados
604-050-00-X	4-cloro-o-cresol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)/26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di-terc-butil-4-hidrox)encil)- 2,4,6-trimetilfenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metilbis(6-(2H-benzotriazol-2-il)- 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metil-4-(1,1-dimetil-6-(1-metil-pentadecil)- fenol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		
604-054-00-1	mezcla de: 2-metoxi-4-(tetrahydro-4-metilen- 2H-piran-2-il)-fenol; 4-(3,6-dihidro-4-metil- 2H-piran-2-il)-2-metoxifenol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)/24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-(3,5',5',5'-tetrametil-(1,1'-bifenil)- 4,4'-diil)-bis(oximetileno))-bis-oxirano		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)/22-36-37		
605-027-00-7	mezcla de: 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7- metano-1H-indeno-6-carboxaldehído; 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H- indeno-5-carboxaldehído		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)/24-37-61		
606-051-00-0	4-pentilciclohexanona		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutilamino)-2-hidroxi-2'-carboxi- benzofenona		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluroxipir-mepyl (ISO) [1] fluroxipir-butometyl (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-273-00-0	7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetilbutiriloxi)-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil)-3,5-dihidroxiheptanoato de amonio		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	3-amino-2-butenato de 2-(N-bencil-N-metilamino)etil		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	benzoiloxibenceno-4-sulfonato de sodio		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	complejo de cinc de bis[(1-metilimidazol)-(2-etil-hexanoato)]		405-635-0	—	Xi; R38-41 N: R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-277-00-2	mezcla de: 2-(hexilito)etilamina, clorhidrato; propionato de sodio		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	mezcla de isómeros de: fenilnaftalenosulfonato de sodio; naitilbencenosulfonato de sodio		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	mezcla de: bis (hidrogenomaleato) de n-octadecilaminodietilo; hidrogenomaleato-hidrogenofalato de n-octadecilaminodietilo		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	4-cloro-1-hidroxibutano-1-sulfonato de sodio		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	mezcla de: 3-[3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-(1,1-dimetil)-4-hidroxifenil]propionatos de C7-C9 alquilo ramificados y lineales		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	acetato de 2-acetoximetil-4-benciloxibut-1-ilo		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-283-00-5	E-etil-4-oxo-4-fenilcrotonato		408-040-4	15121-89-8	Xn: R21/22 Xi: R38-41 R43 N: R50-53	Xn: N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	mezcla (9:1) de: 3,3'-(1,4-fenilenbis(carbonilimino-3,1-propanodilimino))bis(10-amino-6,1,3-dicloro)-4,1,1-trifenodioxazindisulfonato de sodio; 3,3'-(1,4-fenilenbis(carbonilimino-3,1-propanodilimino))bis(10-amino-6,1,3-dicloro)-4,1,1-trifenodioxazindisulfonato de litio		410-040-4	136213-76-8	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	mezcla de: ácido 7-(((3-amino(phenil)sulfo- nil)amino)-naftaleno-1,3-disulfónico; 7-(((3-amino(phenil)sulfo)amino)-naftaleno-1,3-disulfonato de sodio; 7-(((3-amino(phenil)sulfo)amino)-naftaleno-1,3-disulfonato de potasio		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	mezcla de: 7-[[[3-[[[4-((2-hidroxi-naftil)azo)fenil]azo]fenil]sulfonyl]amino]naftaleno-1,3-disulfonato de sodio y de potasio		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-287-00-7	O-(1-metil-2-metacrililoiloxi-etil)-1,2,3,6-tetrahidrofalato de O'-metilo		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	(e)-(3-(1-(3-(e-6-dicloro-5-cianopirimidin-5-il(metil)amino)propil)-1,6-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridiazol)-4-sulfonato)fenilsulfamoyl(falocianin-a,b,d-trisulfonato(6-))niquelato II de tetrasodio, donde a es 1 o 2 o 3 o 4, b es 8 o 9 o 10 o 11, c es 15 o 16 o 17 o 18, d es 22 o 23 o 24 o 25 y donde e y f aparecen simultáneamente, son 2 y 4 o 4 y 2 respectivamente		410-160-7	148732-74-5	Xi: R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-289-00-8	ácido 3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxi)butilaminocarbonil-4-hidroxi-1-naftalil)nitro)propanoico		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	mezcla (proporción desconocida) de: amonio 1-C14-C18-alquiloxycarbonil-2-(3-aliloxi-2-hidroxi)propoxycarbonil)etan-1-sulfonato; amonio 2-C14-C18-alquiloxycarbonil-1-(3-aliloxi-2-hidroxi)propoxycarbonil)etan-1-sulfonato		410-540-2	—	Xi: R38 R43 N: R50-53	Xi: N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-291-00-9	carboxilato de dodecil-ω-(C5/C6-cicloalquil)alquilo		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-292-00-4	mezcla de: ácido [1-(metoximetil)-2-(C12-alcoxi)-etoxi]acético; ácido [1-(metoximetil)-2-(C14-alcoxi)-etoxi]acético		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-293-00-X	mezcla de: éter mono-2,4,6-trimetilnonildifenílico de di-sulfonato de N-aminoetilpiperazonio; éter di-2,4,6-trimetilnonildifenílico de di-sulfonato de N-aminoetilpiperazonio		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2)-26-36/37/39-61		
607-294-00-5	2-benzoiloxi-1-hidroxietan-sulfonato de sodio		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	mezcla de: fosfonoetan-1,2-dicarboxilato de tetrasodio; fosfonobutan-1,2,3,4-tetracarboxilato de hexasodio		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	mezcla de: tetraésteres de pentaeritriol con ácido heptanoico y ácido 2-etilhexanoico		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	ácido (E-E)-3,3'-(1,4-fenilendimetiliden)bis(2-oxobornan)-10-sulfónico		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-(trimetilamonio)etoxicarboxibencen-4-sulfonato		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	3-(acetilto)-2-metil-propanato de metilo		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-300-00-6	[2-(5-cloro-2,6-difluoropirimidin-4-ilamino)-5-(6-sulfamoi-c,d-sulfonatoftalocianin-a-il-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonilamino)benzoato(5-)]cuprato(II) de trisodio donde a = 1, 2, 3 o 4, b = 8, 10 o 11, c = 15, 16, 17 o 18, d = 22, 23, 24 o 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-301-00-1	mezcla de: ácido de dodecanoico; ésteres de poli(1-7)lactato del ácido dodecanoico		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
607-302-00-7	mezcla de: ácido tetradecanoico; ésteres de poli(1-7)lactato del ácido tetradecanoico		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	ácido de 1-ciclopropil-6,7-difluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-carboxílico		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat. 3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-clorofenil)-2-fenil-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]butanonitrilo		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butil-N-fenetilamino)fenil)etilen-1,1,2-tricarbonitrilo		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benciloxi)fenilacetronitrilo		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hidrazina-tri-nitrometano		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-bromo-1-(2-furil)-2-nitroetileno		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	mezcla (2:1:1) de: N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6-[2-amino-4-(o 6)-hidroxi-(o 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]-6''-(1-carbaniloil-2-hidroxi-prop-1-enilazo)-5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenceno-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-cromato de trisodio; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis(1-carbaniloil-2-hidroxi-prop-1-enilazo)-5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenceno-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-cromato de trisodio; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis[2-amino-4-(o 6)-hidroxi-(o 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenceno-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-cromato de trisodio		402-850-1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
611-044-00-0	mezcla de: bis[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; bis[1-[(2-hidroxi-4-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; bis[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; [[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; [[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; ((1-(4(oxo-5-nitro-2-oxido-5-pentilfenilazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-óxido-5-pentilfenilazo)-2-naftolato))cromato(1-) de C12-C14-terc-alquilamonio		403-720-7	117527-94-3	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxibutil)-N-etil]amino-2-metilfenilazo]-3-acetil-5-nitrotiofeno		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-metilazobenceno		407-590-2	43151-99-1	T: R25 Xn: R48/22 R43 N: R50-53	T: N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2-)/22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	mezcla (1:1) de: 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorobenzotiazol-2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorobenzotiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	mezcla (1:1) de: 2-[[4-[bis(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorobenzotiazol; 2-[[4-[bis(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorobenzotiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
611-049-00-8	7-[4-(3-dietilaminopropilamino)-6-(3-dietilamino-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-hidroxi-3-(4-fenilazofenilazo)-naftaleno-2-sulfonato, ácido acético, ácido láctico (2:1:1)]		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-22-36/37-61		
611-051-00-9	cloruro de 2-(4-(N-etil-N-(2-hidroxi)etil)amino-2-metilfenil)azo-6-metoxi-3-metil-benzotiazolio		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	complejo de hierro de agua-[5-[[2,4-dihidroxi-5-[(2-hidroxi-3,5-dinitrofenil)azo]fenil]azo]-2-naftalensulfonato] de monosodio		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	mezcla de: cloruro de trihexadecilmetilamonio; cloruro de dihexadecilmetilamonio		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-26-39-60-61		
612-157-00-8	clorhidrato de (Z)-1-benzo[b]tien-2-iletanona oxima		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	mezcla de: bis(5-dodecil-2-hidroxibenzald-oximato) de cobre (II). El grupo alquílico C12 está ramificado, 4-dodecilsalicilaldoxima		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Productos de reacción de: trimetilhexametileno diamina (mezcla de 2,2,4-trimetil-1,6-hexanodiamina y 2,4,4-trimetil-1,6-hexanodiamina, catalogada en EINECS), epóxido 8 (derivados de mono[(C10-C16-alquilo)metil]oxirano) y ácido p-tolueno-sulfónico		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-terc-butil-5-(4-terc-butilbenziltio)-4-cloropiridazin-3(2H)-ona		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(piperazina-1,4-diil)dipropil]bis(1H-bencimidazo[2,1-b]benzo[l,m,n][3,8]fenantrolina-1,3,6-triona		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
613-151-00-8	1-(3-mesiloxi-5-tritiloximetil-2-D-treofuril)timina		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	N-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)carbamato de fenilo		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-tricloropiridina		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-cloro-2,3-difluoropiridina		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-butil-4-cloro-5-formilimidazol		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-metoximetilpirimidina		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi: R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dicloro-5-trifluorometil-piridina		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-{4-(1,1-dimetiletil)fenil}-etoxil]quinazolina		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	dibromohidrato de (1S)-2-metil-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptano		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	3-isocianatosulfonil-2-tiofen-carboxilato de metilo		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Nº índice	Denominación química	Notas explicativas sobre las sustancias	Nº CE	Nº CAS	Clasificación	Etiquetado	Límites de concentración	Notas explicativas sobre los preparados
615-023-00-7	éster metílico del ácido 2-(isocianatosulfonilmetil)benzoico(alt.): benzoato de 2-(isocianato sulfonilmetil) metilo		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn: R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2)-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dicloro-4-etil-2-hidroxifenil)-2-(3-pentadecilfenoxi)-butanamida		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-cloro-3-ciano-5-formil-2-tienilazo)-5'-dietilamino-2-metoxiacetanilida		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-cloro-7-metilpirazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-il)propil)-2-(2,4-di-terc-pentilfenoxi)octanamida		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	mezcla de: 2,2',2'',2'''-(etilenodinitrilotetraquis-N,N-di(C16)alquilacetamida: 2,2',2'',2'''-(etilenodinitrilotetraquis-N,N-di(C18)alquilacetamida		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometilisobutiramida		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2)-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenoxi)-N-(3,5-dicloro-4-etil-2-hidroxifenil)-hexanamida		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-(2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)-fenil-aminocarbonil)-2,6-difluorobenzamida		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
616-051-00-2	mezcla de: 2,4-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-tolueno; 2,6-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-tolueno		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metilbenzoi)peróxido		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2)-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	ciproconazol (ISO) (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-clorofenil)-3-ciclopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2)-36/37-60-61		

ANEXO - B1

•B.10. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VITRO* EN MAMÍFEROS**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 473 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* tiene por objeto detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo (1) (2) (3). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. No obstante, el presente método no está pensado para medir aberraciones de ese tipo ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la inducción de cánceres en los seres humanos y los animales de experimentación.

En el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas, estirpes celulares o cultivos de células primarias. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad cariotípica, el número y la diversidad cromosómica y la frecuencia de las aberraciones cromosómicas espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca sino que se deban a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (4) (5).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, éstos actúan por mecanismos distintos de la lesión directa del ADN.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Endorreduplicación: proceso en el que, en lugar de entrar en mitosis tras la fase S de replicación del ADN, el núcleo inicia otra fase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

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

Aberración numérica: un cambio en el número de cromosomas a partir del número normal propio de las células empleadas.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los cultivos celulares a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, tras lo cual se tratan a intervalos preestablecidos con una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se recolectan las células, se tiñen y se observan al microscopio aquéllas que se encuentren en la metafase con el fin de detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Células

Pueden emplearse líneas celulares, estirpes o cultivos de células primarias, incluidas las células humanas (fibroblastos de hámster chino, linfocitos de la sangre periférica de humanos o de otros mamíferos, etc.).

1.4.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Para mantener los cultivos se emplean medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, concentración de CO_2 , temperatura y humedad). En el caso de las líneas celulares establecidas y las estirpes, se comprobará regularmente la estabilidad del número cromosómico modal y la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán los cultivos contaminados. Debe conocerse la duración del ciclo celular normal de las células empleadas en esas condiciones de cultivo.

1.4.1.3. Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas y estirpes: las células se obtienen de cultivos madre, se siembran en un medio de cultivo a una densidad a la cual los cultivos no confluyan antes del momento de la recolección y se incuban a 37°C .

Linfocitos: se añade sangre completa tratada con un anticoagulante (por ejemplo, heparina), o bien linfocitos aislados procedentes de sujetos sanos, a un medio de cultivo que contenga un mitógeno (por ejemplo, fitohemaglutinina) y se incuban a 37°C .

1.4.1.4. Activación metabólica

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) o una mezcla de fenobarbital y β -nafto flavona (10) (11) (12).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 al 10% v/v en el medio de ensayo final. La elección del sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

Son varias las técnicas —como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadores específicas— que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (por ejemplo, por la importancia de la isoenzima del citocromo P450 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. *Condiciones del ensayo*

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de la S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Ésta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular.

1.4.2.2. *Concentraciones de exposición*

Para determinar la mayor concentración de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular, como el grado de confluencia, el recuento de células viables o el índice mitótico. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

Se emplearán al menos tres concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 2 y $\sqrt{10}$. En el momento de la recolección, con la concentración mayor debe producirse una reducción considerable del grado de confluencia, el recuento celular o el índice mitótico (en todos los casos superior al 50%). El índice mitótico sólo constituye una medida indirecta de los efectos citotóxicos o citostáticos y está relacionado con el tiempo transcurrido desde el tratamiento. No obstante, cabe utilizar dicho índice para los cultivos en suspensión en los cuales las demás mediciones de toxicidad pueden resultar engorrosas y poco prácticas. Los datos relativos a la cinética del ciclo celular, como el tiempo medio de generación (TMG), pueden servir de información adicional. Sin embargo, el TMG es una media general que no siempre refleja la existencia de subpoblaciones que presentan retraso. Además de ello, incluso un ligero aumento del tiempo medio de generación puede asociarse a un retraso muy importante en el tiempo de mayor producción de aberraciones.

En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml o 0,01 M.

En el caso de sustancias escasamente solubles que no resultan tóxicas a concentraciones inferiores al límite de solubilidad, la mayor dosis empleada deberá corresponder a una concentración superior a dicho límite en el medio de cultivo final al terminar el período de tratamiento. En algunos casos (por ejemplo, cuando se produce toxicidad únicamente con concentraciones superiores a la concentración mínima de insolubilidad), es aconsejable hacer pruebas con varias concentraciones con precipitación visible. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final del tratamiento, pues ésta pueda variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3. *Controles positivos y negativos*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique ésta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

En los controles positivos debe emplearse un clastógeno conocido con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento reproducible y detectable respecto a la frecuencia espontánea, que ponga de manifiesto la sensibilidad del sistema de ensayo.

Las concentraciones del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Activación metabólica	Sustancia	Nº CAS	Nº Eines
Ausencia de activación metabólica exógena	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
	Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	212-072-2
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5	200-281-1
Presencia de activación metabólica exógena	Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
	Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán, para cada período de recolección, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los cultivos del ensayo. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3. Procedimiento

1.4.3.1. Tratamiento con la sustancia de ensayo

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. Los linfocitos deben empezar a tratarse unas 48 horas después de la estimulación mitogénica.

- 1.4.3.2. Como norma, deben prepararse dos cultivos para cada concentración y se recomienda seriamente hacer lo propio en el caso de los controles negativos o el disolvente. Si se demuestra, sobre la base de datos anteriores, que la diferencia entre los dos cultivos es mínima (13) (14), puede bastar un solo cultivo para cada concentración.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (15) (16).

1.4.3.3. Recolección de las células

En el primer experimento se exponen las células a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante 3 a 6 horas. Se toma una muestra transcurrido un período, desde el inicio del tratamiento, de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (12). Si este protocolo da resultados negativos con y sin activación, debe efectuarse otro experimento sin activación, pero con tratamiento continuo hasta que se tome la muestra tras un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal. Algunas sustancias químicas se detectan mejor con un tiempo de tratamiento y toma de muestra superior a dicho período. La obtención de resultados negativos en presencia de activación metabólica debe confirmarse caso por caso. Si dicha confirmación no se considera necesaria, debe justificarse.

1.4.3.4. Preparación de los cromosomas

Se tratan los cultivos celulares con Colcemid® o colchicina por lo general durante un período de 1 a 3 horas antes de la recolección. Los cultivos celulares se recolectan y procesan por separado para preparar los cromosomas. Dicha preparación incluye el tratamiento hipotónico de las células, la fijación y la tinción.

1.4.3.5. Análisis

Antes de analizarlas al microscopio, se asignará un código independiente a cada preparación, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, todos los tipos de células analizadas deben contener un número de centrómeros igual al número modal ± 2 . Deben analizarse al menos 200 metafases bien extendidas en cada concentración y control y, en su caso, repartidas de forma equilibrada entre los cultivos dobles. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones.

Pese a que el objeto del ensayo consiste en detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar los posibles casos de poliploidía y endorreducción.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Dado que la unidad experimental es la célula, se evaluará el porcentaje de éstas que presenta aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los cultivos experimentales y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

Asimismo, se registrarán las determinaciones de citotoxicidad realizadas en paralelo en todos los cultivos tratados y los controles negativos de los principales experimentos sobre aberraciones.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. En el punto 1.4.3.3 se trata la pertinencia de confirmar los resultados negativos. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible del número de células que presentan aberraciones cromosómicas, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (3) (13). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

El aumento del número de células poliploides puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir procesos mitóticos y de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento del número de células con cromosomas endorreducidos puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (17) (18).

No se considerarán mutágenas en el sistema de ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en los cultivos de células somáticas de mamífero. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en los cultivos de células somáticas de mamífero.

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

- tipo y procedencia,
- características del cariotipo e idoneidad del tipo de células empleadas,
- ausencia de micoplasma, si procede,
- información sobre la duración del ciclo celular,
- sexo de los donantes de sangre, sangre completa o linfocitos aislados y mitógeno empleado,
- número de pases, si procede,
- métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede,
- número modal de cromosomas.

Condiciones del ensayo:

- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración de la exposición de las células,
- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos a la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.),
- composición del medio, concentración de CO₂, si procede,
- concentración de la sustancia de ensayo,
- volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida,
- temperatura de incubación,
- tiempo de incubación,
- duración del tratamiento,
- densidad celular en el momento de la siembra, si procede,
- tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,
- controles positivos y negativos,
- métodos de preparación de los portaobjetos,
- criterios de recuento de las aberraciones,

- número de metafases analizadas,
- métodos de determinación de la toxicidad,
- criterios empleadas para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos.

Resultados:

- signos de toxicidad (grado de confluencia, datos del ciclo celular, recuentos celulares, índice mitótico, etc.),
- signos de precipitación,
- datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado,
- definición de las aberraciones, incluidos los gaps,
- número de células que presentan aberraciones cromosómicas e indicación por separado del tipo de dichas aberraciones en cada cultivo tratado y cada control,
- variaciones de la ploidía, en su caso,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos, si se han realizado,
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo,
- datos sobre controles historicos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427—432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1—175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147—204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297—305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.

- (8) Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83—90.
 - (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277—290.
 - (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175—177.
 - (11) 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., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.
 - (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241—261.
 - (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141—154.
 - (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139—149.
 - (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91—103.
 - (16) 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, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795—801.
 - (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403—413.
 - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362—1364.
-

ANEXO - B2

«B.11. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS IN VIVO EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 475 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* en mamíferos se realiza para detectar aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por la sustancia de ensayo en células de médula ósea de animales —por lo general roedores— (1) (2) (3) (4). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores guardan relación con el cáncer en los seres humanos y los sistemas experimentales.

En este ensayo se utilizan habitualmente roedores. El tejido diana es la médula ósea por estar muy vascularizada y por contener una población de células de ciclo corto que pueden aislarse y tratarse con facilidad. En el presente método no se consideran otras especies ni otros tejidos diana.

El presente ensayo de aberraciones cromosómicas está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, pues permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la toxicocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie y el tejido. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Endorreduplicación: proceso en el que, en lugar de entrar en mitosis tras la fase S de replicación del ADN, el núcleo inicia otra fase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberración numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de las células empleadas.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células de médula ósea y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Selección de la especie animal

Si bien suelen emplearse la rata, el ratón y el hámster chino, puede utilizarse otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60%.

1.4.1.3. Preparación de los animales

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días.

1.4.1.4. Preparación de las dosis

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Disolvente o vehículo

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. Controles

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones estructurales *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá

considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº Eines
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. Número y sexo de los animales

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco hembras y cinco machos analizables cada uno. Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. Pauta de tratamiento

Las sustancias de ensayo se administran preferiblemente en una sola vez, aunque también puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

Se toman dos muestras en momentos distintos tras el tratamiento administrado en un día. En el caso de los roedores, la primera muestra se toma transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (éste suele durar de 12 a 18 horas) desde el tratamiento. Dado que el tiempo necesario para que la sustancia de ensayo se asimile y se metabolice, así como el efecto de ésta sobre la cinética del ciclo celular pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda tomar otra muestra 24 horas después de la primera. Si se siguen pautas de más de un día, ha de tomarse una muestra transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde la última administración.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuno, que en el caso de los ratones es de unas tres a cinco horas y en el de los hamsters chinos, de unas cuatro a cinco horas. Se toman las células de la médula ósea y se analizan en busca de aberraciones cromosómicas.

1.5.3. Dosis

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (5). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el período de muestreo posterior se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por "dosis máxima" la que produzca tales signos de toxicidad que si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción del índice mitótico superior al 50%).

1.5.4. Ensayo límite

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. Administración de las dosis

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. Preparación de los cromosomas

Se extrae la médula ósea inmediatamente después del sacrificio, se trata con una solución hipotónica y se fija. A continuación, se extienden las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7. Análisis

Se evalúa la citotoxicidad determinando el índice mitótico en un mínimo de 1 000 células por animal, en todos los animales tratados (incluidos los controles positivos) y en los controles negativos sin tratar.

Deben analizarse al menos 100 células de cada animal. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlas al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células analizadas, el número de aberraciones por célula y el porcentaje de células que presentan aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (6). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

El aumento de la poliploidía puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento de la endorreduplicación puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (7) (8).

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas,
- número, edad y sexo de los animales,
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,
- fundamento de la selección de la dosis,
- preparación de la sustancia de ensayo,

- administración de la sustancia de ensayo,
- fundamento de la elección de la vía de administración,
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,
- calidad de los alimentos y el agua,
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,
- métodos de determinación de la toxicidad,
- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento,
- métodos de preparación de los portaobjetos,
- criterios de recuento de las aberraciones,
- número de células analizadas por animal,
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad,
- índice mitótico,
- tipo y número de aberraciones observadas en cada animal,
- número total de aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar,
- número de células con aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar,
- variaciones de la ploidía, en su caso,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos, si se han realizado,
- datos de los controles negativos realizados en paralelo,
- datos sobre controles históricos negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar,
- datos de los controles positivos realizados en paralelo.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275—306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, 157—165.

- (3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
 - (4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305—312.
 - (5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313—319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184—232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.* 119, pp. 403—413.
 - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363—1364.
-

ANEXO - B3

«B.12. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO IN VIVO**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 474 sobre el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores).

El ensayo de micronúcleos tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérico en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados. Si los animales se tratan de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede emplearse como parámetro en el ensayo el número de eritrocitos maduros (normocromáticos) con micronúcleos en la sangre periférica respecto a un número determinado de eritrocitos maduros.

El presente ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Centrómero (cinetocoro): región (o regiones) del cromosoma que se asocia a 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.

Micronúcleo: núcleo pequeño, adicional al núcleo celular principal y separado de él, y producido durante la telofase de la mitosis o la meiosis por fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros retardados.

Eritrocito normocromático: eritrocito maduro que carece de ribosomas y que se distingue del eritrocito policromático (inmaduro) mediante tinción selectiva de los ribosomas.

Eritrocito policromático: eritrocito inmaduro, en una fase intermedia de transformación, que aún tiene ribosomas y puede, por tanto, distinguirse del eritrocito normocromático (maduro) mediante tinción selectiva de dichos orgánulos.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada. Si se utiliza médula ósea, se sacrifican los animales a intervalos apropiados tras el tratamiento, se extrae la médula ósea, se preparan los portaobjetos y se tiñen (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Si se emplea sangre periférica, se extrae a intervalos apropiados tras el tratamiento, se preparan frotis y se tiñen (4) (8) (9) (10). En los estudios con sangre periférica las células deben recolectarse lo antes posible después de la última exposición. Se analizan las preparaciones para detectar la presencia de micronúcleos.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Selección de la especie animal

Si se emplea médula ósea, se recomienda el uso de ratones o ratas, pero también pueden utilizarse otras especies de mamíferos adecuadas. Si se emplea sangre periférica, se recomienda el uso de ratones. Ahora bien, puede utilizarse cualquier otro mamífero adecuado, siempre que se trate de una especie en la que el bazo no elimine los eritrocitos micronucleados o en la que se haya demostrado una sensibilidad adecuada para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Deben usarse animales jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60%.

1.4.1.3. Preparación de los animales

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos.

1.4.1.4. Preparación de las dosis

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Disolvente o vehículo

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. Controles

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían formarse micronúcleos *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia del control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
N-etilo-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con micronúcleos aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

Si se emplea sangre periférica, puede aceptarse como control negativo en paralelo una muestra previa al tratamiento, pero únicamente en los estudios cortos (por ejemplo, de una a tres administraciones), si los resultados se encuentran en el intervalo previsto según controles anteriores.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. Número y sexo de los animales

Cada lote tratado y cada control ha de estar compuesto al menos por cinco hembras y cinco machos analizables (11). Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a las sustancias pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. Pauta de tratamiento

No se recomienda ninguna pauta normalizada (una, dos o más administraciones a intervalos de 24 horas, etc.). Pueden aceptarse muestras tomadas en el marco de estudios de larga duración siempre que se haya demostrado que ese tipo de estudio proporciona resultados positivos o, si los resultados son negativos, que ha habido toxicidad o bien que se ha estado aplicando la dosis límite hasta el momento de tomar la muestra. También puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades.

El ensayo puede realizarse de dos maneras:

- a) se administra la sustancia de ensayo a los animales en una sola vez. Se extraen muestras de la médula ósea al menos dos veces, la primera de ellas cuando hayan transcurrido más de 24 horas, pero menos de 48 horas desde el tratamiento. Debe respetarse un intervalo adecuado entre las tomas. Si se extraen muestras antes de que transcurran 24 horas desde el tratamiento, deberá justificarse. Las muestras de sangre

periférica han de tomarse al menos en dos ocasiones, la primera de ellas cuando haya transcurrido un mínimo de 36 horas desde el tratamiento. Tras la primera toma, se respetan intervalos adecuados, sin sobrepasar las 72 horas. Si se observa una respuesta positiva en una toma de muestras, no es preciso realizar más.

- b) si se efectúan dos o más administraciones diarias (por ejemplo, dos o más administraciones a intervalos de 24 horas), ha de tomarse una muestra transcurridas de 18 a 24 horas desde la última administración si se trata de médula ósea, y de 36 a 48 horas desde la última administración en el caso de la sangre periférica (12).

Si procede, pueden aplicarse otros tiempos de muestreo adicionales.

1.5.3. Dosis

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (13). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por "dosis máxima" la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos en la médula ósea o la sangre periférica).

1.5.4. Ensayo límite

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afin, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. Administración de las dosis

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. Preparación de la médula ósea o la sangre periférica

Por lo general, la médula ósea se extrae del fémur o la tibia de los animales recién sacrificados. Las células suelen tomarse del fémur o la tibia, se preparan y se tiñen según métodos establecidos. La sangre periférica se extrae de la vena caudal o de otro vaso sanguíneo adecuado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital (8) (9) (10) o se extienden en frotis y luego se tiñen. Si se emplea un colorante específico del ADN [por ejemplo, naranja de acridina (14) o Hoechst 33258 más pironina-Y (15)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN, pero no por ello han de descartarse los colorantes convencionales (coloración de Giemsa, etc.). También pueden utilizarse otros sistemas [por ejemplo, columnas de celulosa para eliminar las células nucleadas (16)], siempre que se tenga constancia de que resultan adecuados para la preparación de micronúcleos en laboratorio.

1.5.7. Análisis

Para cada animal, se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros+maduros) en un recuento de al menos 200 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1 000 si se trata de sangre periférica (17). Antes de analizarlos al microscopio, se codifican independientemente todos los por-

taobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Se determinará la cantidad de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 2 000 eritrocitos inmaduros por animal. Puede obtenerse más información contando los eritrocitos maduros con micronúcleos. En el análisis de los portaobjetos la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos no debe ser inferior al 20% del valor del control. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede determinarse la cantidad de micronúcleos en un mínimo de 2 000 eritrocitos maduros por animal. Pueden emplearse sistemas de análisis automatizados (análisis de la imagen o citometría de flujo continua de suspensiones celulares) en lugar del recuento manual, siempre que estén debidamente justificados y validados.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Para cada animal analizado se relacionará por separado el número de eritrocitos inmaduros, el de eritrocitos inmaduros micronucleados y la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, se proporcionarán también los datos relativos a los eritrocitos maduros, caso de haberse recogido. Se facilitarán, para cada animal, la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de los mismos y, si procede, el porcentaje de eritrocitos micronucleados. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento del número de células micronucleadas relacionado con la dosis, claro aumento del número de dichas células en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (18) (19). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de micronúcleos indica que la sustancia de ensayo induce la formación de micronúcleos, que son consecuencia de una lesión de los cromosomas o del aparato mitótico de los eritroblastos de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no induce la formación de micronúcleos en los eritrocitos inmaduros de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas,
- número, edad y sexo de los animales,
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- datos de los controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo de dosis, si se ha llevado a cabo,
- fundamento de la selección de la dosis,
- preparación de la sustancia de ensayo,
- administración de la sustancia de ensayo,
- fundamento de la elección de la vía de administración,
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,
- calidad de los alimentos y el agua,
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,
- métodos de preparación de los portaobjetos,
- métodos de determinación de la toxicidad,
- criterios de recuento de los eritrocitos inmaduros micronucleados,
- número de células analizadas por animal,
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad,
- proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos,
- número de eritrocitos inmaduros micronucleados observados en cada animal,
- media $\pm$ desviación estándar de eritrocitos inmaduros micronucleados de cada lote,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos y métodos aplicados,
- datos de los controles históricos negativos y los realizados en paralelo al ensayo,
- datos de los controles positivos realizados en paralelo.

Discusión de los resultados.**Conclusiones.**

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187—190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9—15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61—118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29—80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555—558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103—112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513—522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245—249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83—98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153—159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293—304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313—319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313—319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241—247.
- (15) 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, pp. 269—275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91—104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97—99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.

ANEXO - B4

•B.13/14. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN INVERSA EN BACTERIAS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 471 sobre el ensayo de mutación inversa en bacterias (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se emplean cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* auxotróficas respecto a un aminoácido para detectar mutaciones puntuales que impliquen sustitución, adición o delección de uno o varios pares de bases del ADN (1) (2) (3). El ensayo se fundamenta en la detección de mutaciones que reversion mutaciones presentes en las cepas experimentales y restablecen la capacidad funcional de las bacterias de sintetizar un aminoácido esencial. Las bacterias revertientes se detectan por su capacidad de crecer en ausencia del aminoácido que la cepa experimental parental no es capaz de sintetizar.

Las mutaciones puntuales ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que dichas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la formación de tumores en los seres humanos y los animales de experimentación. El ensayo de mutación inversa en bacterias es rápido, poco costoso y relativamente sencillo de realizar. Muchas de las cepas experimentales presentan algunas características que las hacen más sensibles para la detección de mutaciones: secuencias de ADN sensibles en los sitios de reversión, mayor permeabilidad celular a las moléculas grandes y eliminación de sistemas de reparación del ADN o intensificación de los procesos de reparación del ADN propensos a errores. La especificidad de las cepas experimentales puede proporcionar información útil sobre los tipos de mutaciones inducidas por sustancias genotóxicas. Existe una importante base de datos relativa a una gran variedad de estructuras que recoge los resultados de ensayos de mutación inversa en bacterias. Asimismo, se han desarrollado metodologías bien consolidadas para analizar productos químicos, incluidos los compuestos volátiles, con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Ensayo de mutación inversa en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*: ensayo que permite detectar una mutación en una cepa auxotrofa para un aminoácido (histidina y triptófano, respectivamente), que la transforma en una cepa independiente del aporte externo de dicho aminoácido.

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: agentes que provocan el cambio de una base en el ADN. En un ensayo de reversión el cambio puede producirse en el sitio de la mutación original o en un segundo sitio del genoma bacteriano.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: agentes que provocan la adición o delección de uno o más pares de bases en el ADN, lo que modifica el marco de lectura en el ARN.

1.3. CONSIDERACIONES INICIALES

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se utilizan células procariotas, que difieren de las células de mamífero en aspectos como la absorción, el metabolismo, la estructura cromosómica y los procesos de reparación del ADN. En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien tales sistemas no pueden reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Por tanto, el ensayo no proporciona información directa sobre la potencia mutagénica y carcinogénica de una sustancia determinada en mamíferos.

El ensayo de mutación inversa en bacterias se emplea habitualmente para hacer una selección inicial de la actividad genotóxica y, en particular, de la actividad inductora de mutaciones puntuales. Una importante base de datos ha puesto de manifiesto que muchas sustancias químicas que dan un resultado positivo en este ensayo también presentan actividad mutagénica en otros ensayos. También hay agentes mutagénicos que no son detectados por este ensayo. Esas deficiencias pueden deberse a la naturaleza específica del efecto detec-

tado, a diferencias de la activación metabólica o de la biodisponibilidad. Por otra parte, los factores que incrementan la sensibilidad del ensayo de mutación inversa en bacterias pueden llevar a sobrestimar la actividad mutagénica.

El ensayo de mutación inversa en bacterias puede no ser apropiado para evaluar determinadas clases de sustancias químicas como los compuestos muy bactericidas (por ejemplo, algunos antibióticos) y aquellos de los que se cree (o se sabe) que interfieren de forma específica en el sistema de replicación celular de los mamíferos (por ejemplo, algunos inhibidores de la topoisomerasa y algunos análogos de los nucleósidos). En esos casos están más indicados los ensayos de mutaciones en mamíferos.

Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, la correlación no es absoluta, sino que depende de la clase química. Además de ello, hay carcinógenos que el ensayo no detecta, pues actúan por mecanismos que no son genotóxicos o que no existen en las células bacterianas.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen las suspensiones de células bacterianas a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica exógena. En el método de incorporación en placa, las suspensiones se mezclan con agar de recubrimiento y se vierten inmediatamente sobre una placa en medio mínimo. En el método de preincubación, la mezcla de tratamiento se incuba y luego se mezcla con agar de recubrimiento antes de verterla sobre una placa en medio mínimo. En ambos casos, tras dos o tres días de incubación, se cuentan las colonias revertientes y se compara su cantidad con la de colonias revertientes espontáneas en las placas de control con disolvente.

Entre los diversos procedimientos descritos para realizar el ensayo de mutación inversa en bacterias los métodos siguientes se utilizan comúnmente: incorporación en placa (1) (2) (3) (4), preincubación (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluctuación (9) (10) y suspensión (11). También se han descrito modificaciones para los ensayos con gases y vapores (12).

Los procedimientos descritos en el método corresponden principalmente a la incorporación en placa y a la preincubación. Ambos son aceptables para realizar experimentos con y sin activación metabólica. El método de preincubación resulta más eficaz para detectar determinadas sustancias que pertenecen a clases químicas que incluyen nitrosaminas alifáticas de cadena corta, metales divalentes, aldehídos, azocolorantes y diazocompuestos, alcaloides de la pirolizidina, compuestos alílicos y nitrocompuestos (3). También se reconoce que algunas clases de mutágenos no siempre se detectan con procedimientos ordinarios como los métodos de incorporación sobre placa y de preincubación. Esos casos deben considerarse "especiales" y se recomienda seriamente utilizar otros procedimientos para detectarlos. Se han determinado los "casos especiales" siguientes (junto con ejemplos de procedimientos de detección eficaces): azocolorantes y diazocompuestos (3) (5) (6) (13), gases y sustancias químicas volátiles (12) (14) (15) (16) y glicósidos (17) (18). Cualquier desviación respecto al procedimiento ordinario ha de estar científicamente justificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. Preparación

1.5.1.1. Bacterias

Se dejan crecer cultivos bacterianos recientes hasta el final de la fase exponencial o hasta el principio de la fase estacionaria (unas 10^9 células por ml). No deben emplearse cultivos que se encuentren al final de la fase estacionaria. Es fundamental que los cultivos utilizados para el experimento contengan un título elevado de bacterias viables. El título puede demostrarse sobre la base de datos de controles anteriores sobre curvas de crecimiento o bien determinando en cada ensayo el número de células viables mediante un experimento de cultivo en placas.

La temperatura de incubación recomendada es de 37°C.

Se emplearán al menos cinco cepas bacterianas, de las cuales cuatro serán de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537, TA97a o TA97; TA98 y TA100), de fiabilidad demostrada y cuya respuesta sea reproducible entre laboratorios. Esas cuatro cepas de *S. typhimurium* poseen pares de bases GC en el sitio de reversión primaria y se sabe que no son capaces de detectar determinados mutágenos oxidantes, agentes de entrecruzamiento e hidracinas. Dichas sustancias son detectadas por las cepas *E. coli* WP2 y *S. typhimurium* TA102 (19), que poseen un par de bases AT en el sitio de reversión primaria. Así pues, se recomienda la combinación de cepas siguiente:

- *S. typhimurium* TA1535 y
- *S. typhimurium* TA1537 y TA97 o TA97a, y
- *S. typhimurium* TA98 y
- *S. typhimurium* TA100 y
- *E. coli* WP2 uvrA o *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) o *S. typhimurium* TA102.

Para detectar mutágenos de entrecruzamiento puede ser mejor incluir TA102 o añadir una cepa de *E. coli* eficaz en la reparación de ADN [por ejemplo, *E. coli* WP2 o *E. coli* WP2 (pKM101)].

Se seguirán procedimientos reconocidos de preparación de cultivos madre, comprobación de marcadores y conservación. Debe demostrarse en cada preparación de cultivo madre congelado que es necesario aportar el aminoácido en cuestión para que haya crecimiento (histidina en las cepas de *S. typhimurium* y triptófano en las de *E. coli*). Se controlarán de igual manera otras características fenotípicas, en concreto la presencia o ausencia de factores R, si procede [resistencia a la ampicilina en las cepas TA98, TA100 y TA97a o TA97, WP2 uvrA y WP2 uvrA (pKM101), y a la ampicilina + tetraciclina en la cepa TA102] y la presencia de mutaciones características (mutación *rfa* en *S. typhimurium* mediante la sensibilidad al violeta cristal, y mutación *uvrA* en *E. coli* o *uvrB* en *S. typhimurium*, mediante la sensibilidad a la luz ultravioleta) (2) (3). Las cepas deben producir un número de colonias revertientes espontáneas por placa en las gamas de frecuencia esperadas sobre la base de datos de controles anteriores del laboratorio y preferiblemente en la gama recogida en las publicaciones.

1.5.1.2. Medio

Se emplearán un agar mínimo adecuado (por ejemplo, con medio mínimo E de Vogel-Bonner y glucosa) y un agar de recubrimiento con histidina y biotina o triptófano para permitir pocas divisiones celulares (1) (2) (9).

1.5.1.3. Activación metabólica

Las bacterias deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (1) (2) o una mezcla de fenobarbital y β -nafto flavona (18) (20) (21). La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 5 al 30% v/v en la mezcla S9. La elección y la condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial. En el caso de los azocolorantes y los diazocompuestos puede estar más indicado utilizar un sistema reductor de activación metabólica (6) (13).

1.5.1.4. Preparación de la sustancia de ensayo

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las bacterias. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las bacterias y la actividad de la S9 (22). Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o un vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua.

1.5.2. Condiciones de ensayo

1.5.2.1. Cepas de ensayo (véase el punto 1.5.1.1)

1.5.2.2. Concentraciones de exposición

Para determinar la mayor concentración de la sustancia de ensayo deben considerarse, entre otros criterios, la citotoxicidad y la solubilidad en la mezcla de tratamiento final.

Puede ser útil determinar la toxicidad y la insolubilidad en un experimento preliminar. La citotoxicidad puede manifestarse por una reducción del número de colonias revertientes, la disminución o la aclaración de la confluencia del césped bacteriano, o la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. La citotoxicidad de una sustancia puede verse alterada en presencia de sistemas de activación metabólica. Ha de valorarse la insolubilidad en forma de precipitación en la mezcla final en las condiciones reales de ensayo, visible por simple observación.

Si se trata de sustancias de ensayo solubles y no citotóxicas, la concentración máxima recomendada es de 5 mg/placa o 5 µl/placa. En el caso de sustancias no citotóxicas que no sean solubles a dicha concentración, una o varias de las concentraciones empleadas resultarán insolubles en la mezcla de tratamiento final. Las sustancias de ensayo que ya sean citotóxicas por debajo de 5 mg/placa o 5 µl/placa deberán ensayarse a concentraciones que llegarán como máximo hasta la concentración citotóxica. El precipitado no ha de interferir en la evaluación.

Se emplearán al menos cinco concentraciones analizables de la sustancia de ensayo con intervalos semilogarítmicos aproximadamente ($\sqrt{10}$) para el experimento inicial. Si se está estudiando la relación respuesta-concentración, puede estar indicado emplear intervalos menores. Para evaluar sustancias que contengan cantidades considerables de impurezas potencialmente mutagénicas podrá considerarse el uso de concentraciones superiores a 5 mg/placa o 5 µl/placa.

1.5.2.3. Controles positivos y negativos

En todos los experimentos deberán realizarse en paralelo controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) específicos de la cepa utilizada, con y sin activación metabólica. Se seleccionarán las concentraciones del control positivo que demuestren ser eficaces en cada experimento.

En los experimentos con sistema de activación metabólica, la sustancia o sustancias de referencia del control positivo se elegirán con arreglo al tipo de cepa bacteriana empleada.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias adecuadas para los controles positivos en ensayos con activación metabólica:

Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
9,10-Dimetilantraceno	781-43-1	212-308-4
7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
2-Aminoantraceno	613-13-8	210-330-9
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	

La sustancia siguiente es apropiada para el control positivo del método de activación metabólica reductora:

Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
Rojo Congo	573-58-0	209-358-4

El 2-aminoantraceno no ha de emplearse como único indicador de la eficacia de la mezcla S9. Caso de emplearlo, todos los lotes de S9 han de caracterizarse asimismo con un mutágeno que requiera activación metabólica mediante enzimas microsomales, como el benzo[a]pireno o el dimetilbenzoantraceno.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos específicas de determinadas cepas para ensayos sin sistema de activación metabólica exógena:

Sustancia	Nº CAS	Nº Eines	Cepa
Azida de sodio	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 y TA 100
2-Nitrofluoreno	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-Aminoacridina	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 y TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 y TA 97a
Hidroperóxido de cumeno	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA y TA 102
N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
4-Nitroquinolina-1-óxido	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
Furilfuramida (AF2)	3688-53-7		Cepas que contengan plásmidos

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán controles negativos sin sustancia de ensayo, únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5.3. Procedimiento

En el método de incorporación sobre placa (1) (2) (3) (4), sin activación metabólica, suele mezclarse 0,05 ml o 0,1 ml de las soluciones de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco (aproximadamente 10^8 células viables) y 0,5 ml de solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. En el ensayo con activación metabólica suele añadirse 0,5 ml de mezcla de activación metabólica que contenga una cantidad adecuada de fracción postmitocondrial (del 5 al 30% v/v en dicha mezcla) al agar de recubrimiento (2,0 ml), las bacterias y la sustancia o solución de ensayo. Se mezcla el contenido de cada tubo y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Se deja solidificar el agar de recubrimiento antes de incubar.

En el método de preincubación (2) (3) (5) (6) se incuba la sustancia o solución de ensayo con la cepa experimental (aproximadamente 10^8 células viables) y la solución tampón de ensayo o el sistema de activación metabólica (0,5 ml), por lo general durante 20 minutos o más a 30-37°C. Después se añade el agar de recubrimiento y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Habitualmente se mezcla 0,05 a 0,1 ml de sustancia o solución de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano y 0,5 ml de mezcla S9 o solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. Se airean los tubos durante la preincubación con un agitador.

Se prepararán tres placas por cada dosis para estimar adecuadamente la variación. Pueden prepararse sólo dos placas por dosis si se justifica científicamente. La pérdida ocasional de una placa no invalida necesariamente el ensayo.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubación

Se incuban todas las placas de un mismo ensayo entre 48 y 72 horas a 37°C. Al término de la incubación, se cuenta el número de colonias revertientes por placa.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se facilitará el número de colonias revertientes por placa, así como el número de colonias revertientes en las placas del control negativo (control con disolvente y control sin tratar, en su caso) y del positivo. Debe proporcionarse el recuento por placa, la media de colonias revertientes por placa y la desviación estándar correspondientes a la sustancia de ensayo y a los controles positivos y negativos (sin tratar y/o con disolvente).

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Los resultados negativos se confirmarán caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones, el método de tratamiento (incorporación sobre placa o preincubación líquida) y las condiciones de activación metabólica.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración en la gama utilizada y/o aumento reproducible con una o varias concentraciones en el número de colonias revertientes por placa al menos en una cepa, con o sin sistema de activación metabólica, etc.) (23). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (24). No obstante, el hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

No se considerarán mutágenas en el ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación inversa en bacterias indica que la sustancia de ensayo induce mutaciones puntuales por sustitución de bases o desplazamientos del marco de lectura en el genoma de *Salmonella typhimurium* y/o *Escherichia coli*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no resulta mutagénica en la especie estudiada.

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del disolvente o vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Cepas:

- cepas utilizadas,
- número de células por cultivo,
- características de las cepas.

Condiciones del ensayo:

- cantidad de sustancia de ensayo por placa (mg/placa o µl/placa), fundamento de la selección de las 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.

Resultados:

- signos de toxicidad,
- signos de precipitación,
- recuentos por placa,
- cantidad media de colonias revertientes por placa y desviación estándar,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos, si se han realizado,
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo, intervalos, medias y desviaciones estándar,
- datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.**Conclusiones.****4. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217—233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69—240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91—96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273—285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13—61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167—177.

- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33—42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141—161.
- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453—465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335—344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzdine and Benzdine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33—47.
- (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2—141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249—258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421—441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780—3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961—4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285—291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85—88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, 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, pp. 175—177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343—350.
- (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83—91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28—65.

ANEXO - B5

«B.17. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*»

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 476 sobre el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* puede realizarse para detectar mutaciones génicas inducidas por sustancias químicas. Entre las líneas celulares adecuadas para el ensayo se encuentran las células de linfoma de ratón L5178Y, las líneas celulares CHO, CHO-AS52 y V79 del hámster chino y las células linfoblastoides humanas TK6 (1). En dichas líneas celulares, los parámetros genéticos más empleados revelan una mutación en los loci de la timidinquinasa (TK) y la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), y en un transgen de la xantina guanina fosforibosiltransferasa (XPRT). Los ensayos de mutación TK, HPRT y XPRT detectan diversos espectros de fenómenos genéticos. La localización autosómica de TK y XPRT permite poner de manifiesto fenómenos genéticos (por ejemplo, deleciones importantes) que no se detectan en el locus HPRT de los cromosomas X (2) (3) (4) (5) (6).

En este ensayo pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas o estirpes celulares. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo y la estabilidad de la frecuencia de mutaciones espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien éste no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados que no reflejen la mutagenicidad intrínseca. Los resultados positivos que no reflejan la mutagenicidad intrínseca pueden deberse a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (7).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo con carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, éstos actúan por mecanismos no genotóxicos o mecanismos ausentes en las células bacterianas (6).

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

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

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: sustancias que provocan la sustitución de uno o varios pares de bases en el ADN.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: sustancias que provocan la adición o deleción de uno o más pares de bases en la molécula de ADN.

Período de expresión fenotípica: tiempo que tardan en desaparecer los productos génicos inalterados de las células mutadas recientemente.

Frecuencia de mutantes: número de células mutantes dividido por el número de células viables.

Crecimiento total relativo: aumento del número de células en el tiempo respecto a una población celular de control; es el producto del crecimiento en suspensión respecto al control negativo por la eficacia de clonado respecto al control negativo.

Crecimiento en suspensión relativo: aumento del número de células durante el período de expresión respecto al control negativo.

Viabilidad: eficacia de clonado de las células tratadas en el momento de la siembra en condiciones selectivas tras el período de expresión.

Supervivencia: eficacia de clonado de las células tratadas cuando se siembran al final del período de tratamiento; suele expresarse respecto a la supervivencia de la población celular de control.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las células deficientes en timidinkinasa (TK) a causa de la mutación $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidinkinasa son sensibles a la TFT, que inhibe el metabolismo y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TFT, mientras que las células normales, que contienen timidinkinasa, no lo son. Del mismo modo, las células deficientes en HPRT o XPRT se seleccionan por su resistencia a la 6-tioguanina (TG) o la 8-azaguanina (AG). Si en los ensayos de mutación génica en células de mamífero se utiliza una sustancia de ensayo análoga a una base o un compuesto afín al agente selectivo, deben considerarse detenidamente sus propiedades, por ejemplo, cuando se sospeche que la sustancia de ensayo presenta toxicidad selectiva en las células mutantes y no mutantes. Así pues, habrá que confirmar la eficacia del sistema o agente de selección cuando se estudien sustancias de estructura afín a la del agente selectivo (8).

Se exponen las células en suspensión o el cultivo en monocapa a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante un período apropiado. Se realiza un subcultivo para determinar la citotoxicidad y dejar que se exprese el fenotipo antes de la selección de los mutantes (9) (10) (11) (12) (13). La citotoxicidad suele determinarse midiendo la eficacia relativa de clonado (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos tras el período de tratamiento. Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un período de tiempo suficiente y específico para cada locus y tipo celular seleccionado, de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima. La frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con agente selectivo y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficacia de clonado (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. Se compara el número de colonias mutantes en el medio selectivo y en el no selectivo para hallar la frecuencia de mutantes.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Células

Entre los diversos tipos de células apropiados para este ensayo se encuentran las de los subclones de L5178Y, CHO, CHO-ASS2, V79 y TK6. Deben emplearse tipos de células que presenten una sensibilidad probada a los mutágenos químicos, una elevada eficacia de clonado y una frecuencia estable de mutaciones espontáneas. Se comprobará la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán las células contaminadas.

El ensayo debe estar diseñado de manera que su sensibilidad y potencia estén predeterminadas. El número de células, cultivos y concentraciones de la sustancia de ensayo ha de reflejar dichos parámetros previamente definidos (14). En cada fase del ensayo, el número mínimo de células viables que sobrevivan al tratamiento deberá estar basado en la frecuencia de mutación espontánea. Por lo general, se emplea una cantidad de células al menos igual a diez veces el inverso de dicha frecuencia. Se recomienda, no obstante, utilizar un mínimo de 10^6 células. Para cerciorarse de que el ensayo proporciona resultados coherentes deberá disponerse de datos de controles históricos adecuados sobre el sistema celular utilizado.

1.4.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados (recipientes de cultivo, temperatura, concentración de CO_2 y humedad). Los medios han de elegirse con arreglo a los sistemas selectivos y los tipos celulares empleados en el ensayo. Es especialmente importante aplicar condiciones de cultivo que favorezcan un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y la capacidad de las células, mutantes y no mutantes, de formar colonias.

1.4.1.3. *Preparación de los cultivos*

Se multiplican células de cultivos madre, se siembran en el medio de cultivo y se incuban a 37°C. Antes de usar los cultivos en el ensayo, puede ser necesario lavarlos de las células mutantes que contengan.

1.4.1.4. *Activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (15) (16) (17) (19) o una mezcla de fenobarbital y β -naftoflavona (19) (20).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 al 10% v/v en el medio de ensayo final. La elección y condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

Son varias las técnicas —como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadoras específicas— que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (por ejemplo, por la importancia de la isoenzima del citocromo P450 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. *Condiciones del ensayo*

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Ésta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular.

1.4.2.2. *Concentraciones de exposición*

Para determinar la concentración máxima de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular, como la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

Se emplearán al menos cuatro concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 1 y $\sqrt{10}$. En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 mg/ml, 5 μ l/ml o 0,01 M.

Las sustancias escasamente solubles deben ensayarse hasta concentraciones iguales o superiores al límite de solubilidad en las condiciones de cultivo. Ha de ponerse de manifiesto la insolubilidad en el medio de tratamiento final al que se exponen las células. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final de tratamiento, pues ésta puede variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3. *Controles*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique ésta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para el control positivo:

Activación metabólica	Locus	Sustancia	Nº CASF	Nº EINECS
Ausencia de activación metabólica exógena	HPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (colonias grandes y pequeñas)	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Presencia de activación metabólica exógena	HPRT	3-metilcolantreno	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetilbenzoantraceno	57-97-6	200-359-5
	TK (colonias grandes y pequeñas)	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrosodimetilamina (para grandes cantidades de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

Pueden utilizarse otras sustancias de referencia adecuadas para el control positivo, por ejemplo, la 5-bromo 2'-desoxiuridina (nº CAS 59-14-3, nº EINECS 200-415-9), si el laboratorio dispone de una base de datos al respecto. Deberá considerarse la utilización en dicho control de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información de controles históricos que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3. *Procedimiento*1.4.3.1. *Tratamiento con la sustancia de ensayo*

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo, en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La duración de la exposición ha de ser suficiente (de tres a seis horas suelen bastar) y puede ampliarse hasta uno o varios ciclos celulares.

Pueden realizarse uno o dos cultivos con cada concentración de la sustancia de ensayo. En el caso de realizarse uno solo, se aumentará el número de concentraciones con el fin de disponer de suficientes cultivos para el análisis (por ejemplo, un mínimo de ocho concentraciones analizables). Deben realizarse dos cultivos para el control negativo (disolvente).

Las sustancias gaseosas o volátiles han de evaluarse con métodos adecuados, tales como recipientes de cultivo herméticos, etc. (21) (22).

1.4.3.2. *Determinación de la supervivencia, la viabilidad y la frecuencia de mutantes*

Al término del período de exposición se lavan las células y se cultivan para determinar la supervivencia y dejar que se exprese el fenotipo mutante. La evaluación de la citotoxicidad suele empezarse después del período de tratamiento, determinado la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos.

Cada locus necesita un tiempo mínimo determinado para que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas recientemente sea casi óptima (un mínimo de seis a ocho días en el caso de HPRT y XPRT y de dos días en el de TK). Las células se cultivan con y sin agente o agentes selectivos para determinar el número de mutantes y la eficacia de clonado, respectivamente. La viabilidad, que sirve para calcular la frecuencia de mutantes, empieza a determinarse al final del período de expresión colocando los cultivos en un medio no selectivo.

Si la sustancia de ensayo da un resultado positivo en el ensayo con L5178Y TK⁺/-, deben medirse las colonias al menos en uno de los cultivos de ensayo (el de la concentración que dé resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Si la sustancia de ensayo da un resultado negativo en el ensayo con L5178Y TK⁺/-, deben medirse las colonias en los controles positivos y negativos. También pueden medirse las colonias en los estudios realizados con TK6TK⁺/-.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos deben incluir la determinación de la citotoxicidad y la viabilidad, los recuentos de colonias y la frecuencia de mutantes en los cultivos tratados y en los controles. Si el resultado del ensayo con L5178Y TK⁺/- es positivo, las colonias se cuentan distinguiendo las grandes de las pequeñas al menos en un cultivo tratado (con la concentración de sustancia de ensayo que dé los resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Debe estudiarse detenidamente la naturaleza molecular y citogenética tanto de las colonias grandes como de las pequeñas (23) (24). En el ensayo TK⁺/-, las colonias se cuentan distinguiendo las de crecimiento normal (grandes) de las de crecimiento lento (pequeñas) (25). Las células mutantes que han sufrido las lesiones genéticas más importantes requieren un tiempo de duplicación mayor, de manera que forman colonias pequeñas. Dichas lesiones suelen variar desde la pérdida de un gen entero hasta las aberraciones cromosómicas visibles en el cariotipo. La inducción de pequeñas colonias mutantes se ha asociado a sustancias que provocan aberraciones cromosómicas importantes (26). Las células mutantes menos afectadas crecen a una velocidad similar a la de las células parentales y forman colonias grandes.

Debe proporcionarse el índice de supervivencia (eficacia de clonado relativa) o el crecimiento total relativo. La frecuencia de mutantes se expresa como el número de células mutantes respecto al número de células supervivientes.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Es preciso confirmar los resultados negativos caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse debidamente. En los experimentos complementarios de aquéllos que hayan dado resultados dudosos o negativos, se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentran la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible de la frecuencia de mutantes, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

- No se considerarán mutágenas en el sistema en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados eran claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas. El elemento más significativo es la relación dosis-respuesta positiva y reproducible. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas.

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo o disolvente,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

- tipo y procedencia,
- número de cultivos celulares,
- número de pases celulares, si procede,
- métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede,
- ausencia de micoplasma.

Condiciones del ensayo:

- fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.),
- composición del medio y concentración de CO₂,
- concentración de la sustancia de ensayo,
- volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida,
- temperatura de incubación,
- tiempo de incubación,
- duración del tratamiento,
- densidad celular durante el tratamiento,
- tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,
- controles positivos y negativos,
- duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede),
- agentes selectivos,
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos,

- métodos empleados para contar las células viables y las mutantes,
- definición del tamaño y el tipo de las colonias consideradas (incluidos, en su caso, los criterios de distinción de colonias "grandes" y "pequeñas").

Resultados:

- signos de toxicidad,
- signos de precipitación,
- datos sobre el pH y la osmolalidad durante la exposición a la sustancia de ensayo, si se han determinado,
- tamaño de las colonias contadas, al menos en los controles positivos y negativos,
- capacidad del laboratorio para detectar mutantes en colonias pequeñas con el sistema L5178Y TK⁺ en su caso,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos, si se han realizado,
- datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo,
- datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar,
- frecuencia de mutantes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306—1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467—485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394—403.
- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, pp. 121—128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235—239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147—204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavourmin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225—251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17—36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135—141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9—17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133—147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK⁺ — TK⁺ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239—268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66—101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365—373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.*, 59, pp. 61—108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, 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, pp. 175—177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91—103.
- (22) 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, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795—801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51—55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) and Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, pp. 161—174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89—102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK⁺ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609—614.

ANEXO - B6

•B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS DE MAMÍFERO**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 483 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero tiene por objeto detectar sustancias que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonias de mamífero (1) (2) (3) (4) (5). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. El presente método no está pensado para detectar aberraciones numéricas ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas.

El presente ensayo detecta alteraciones cromosómicas en las células germinales de las espermatogonias y debería, por tanto, permitir prever la inducción de mutaciones hereditarias en las células germinales.

El ensayo suele realizarse con roedores; es un ensayo citogenético *in vivo* que detecta aberraciones cromosómicas en las mitosis de las espermatogonias. El presente método no se refiere a otras células diana.

Para detectar aberraciones cromatídicas en las espermatogonias es preciso analizar la primera mitosis celular después del tratamiento, antes de que las lesiones desaparezcan en las divisiones celulares siguientes. Puede obtenerse información adicional del análisis de los cromosomas meióticos de células madre de espermatogonias tratadas, para detectar aberraciones cromosómicas de la diacinesis a la metafase I cuando las células tratadas se convierten en espermatocitos.

El presente ensayo *in vivo* está diseñado para determinar si los mutágenos de las células somáticas también son activos en las células germinales. Asimismo, está indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, de la toxicocinética y de los procesos de reparación del ADN.

Los testículos contienen varias generaciones de espermatogonias, que presentan distinta sensibilidad al tratamiento químico. Por tanto, las aberraciones detectadas corresponden a una respuesta global de las poblaciones de espermatogonias tratadas, en las que predominan las células diferenciadas, que son las más numerosas. Según su localización en el testículo y debido a la barrera física y fisiológica de las células de Sertoli, así como a la barrera entre la sangre y el testículo, algunas generaciones de espermatogonias están expuestas a la circulación general y otras no.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberración numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de los animales empleados.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células germinales y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Selección de la especie animal

Si bien suelen emplearse hámsters chinos y ratones machos, pueden utilizarse machos de otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio.

1.4.1.2. Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60%.

1.4.1.3. Preparación de los animales

Se reparten al azar machos adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días antes de empezar el estudio.

1.4.1.4. Preparación de las dosis

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Disolvente o vehículo

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. Controles

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones cromosómicas estructurales en las espermatogonias in vivo con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto al nivel de fondo.

Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Monómero de acrilamida	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. Número de animales

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco machos analizables cada uno.

1.5.2. Pauta de tratamiento

Las sustancias de ensayo se administrarán preferiblemente una o dos veces (uno o dos tratamientos), aunque también puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

En el lote al que se ha administrado la dosis máxima se toman dos muestras tras el tratamiento. Dado que la sustancia de ensayo puede afectar a la cinética del ciclo celular, suele tomarse la primera muestra hacia las 24 horas y la segunda, unas 48 horas después del tratamiento. En los demás lotes se toma una muestra transcurridas 24 horas o un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular desde el tratamiento, salvo que se conozca otro período de muestreo más adecuado para detectar los efectos estudiados (6).

Pueden seguirse otros períodos de muestreo. Por ejemplo, en el caso de sustancias que puedan provocar la pérdida de cromosomas o tener efectos independientes de la fase S, pueden estar indicados períodos de muestreo más cortos (1).

Debe valorarse caso por caso la pertenencia de una pauta de administración repetida. Si se aplica una pauta de ese tipo, los animales deben sacrificarse 24 horas (1,5 veces la duración del ciclo celular) después de la última administración. Cuando proceda, pueden aplicarse períodos de muestreo complementarios.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuno, que en el caso de los ratones es de unas tres a cinco horas y en el de los hámsters chinos, de unas cuatro a cinco horas.

1.5.3. Dosis

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa y protocolo de tratamiento que el estudio principal (7). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por "dosis máxima" la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal.

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en las espermatogonias (por ejemplo, disminución de la proporción entre el número de mitosis de las espermatogonias y el número de metafases I y II de la meiosis; la disminución no ha de ser superior al 50 %).

1.5.4. Ensayo límite

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. Administración de las dosis

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. Preparación de los cromosomas

Inmediatamente después del sacrificio, se preparan suspensiones con células de uno o ambos testículos, se tratan con una solución hipotónica y se fijan. A continuación, se distribuyen las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7. Análisis

Deben analizarse al menos 100 metafases bien extendidas de cada animal (es decir, un mínimo de 500 metafases por lote). La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlos al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células con aberraciones cromosómicas estructurales y el número de aberraciones cromosómicas por célula. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

Si se observan tanto mitosis como meiosis, se determinará la relación entre las mitosis de espermatogonias y la primera y segunda metafases meióticas en una muestra de 100 células en división por cada animal de los lotes tratados y de los controles negativos, con el fin de establecer si ha habido citotoxicidad. Si se observan mitosis únicamente, se determinará el índice mitótico al menos en 1 000 células por animal.

2.2. EVALUACIÓN INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (8). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en las células germinales de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en las células germinales de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos lleguen al tejido diana.

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas,
- número y edad de los animales,
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,
- fundamento de la selección de la dosis,
- fundamento de la elección de la vía de administración,
- preparación de la sustancia de ensayo,
- administración de la sustancia de ensayo,
- fundamento de la elección del momento del sacrificio,

- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerido y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,
- calidad de los alimentos y el agua,
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,
- métodos de determinación de la toxicidad,
- sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento,
- métodos de preparación de los portaobjetos,
- criterios de recuento de las aberraciones,
- número de células analizadas por animal,
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- signos de toxicidad,
- índice mitótico,
- proporción entre el número de mitosis de espermatogonias y el número de metafases I y II de la meiosis,
- tipo y número de aberraciones observadas en cada animal,
- número total de aberraciones por lote,
- número de células con aberraciones por lote,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- análisis estadísticos, si se han realizado,
- datos de los controles negativos realizados en paralelo,
- datos anteriores sobre controles negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar,
- datos de los controles positivos realizados en paralelo,
- variaciones de la ploidía, en su caso.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.
 - (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
 - (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
-

ANEXO - B7

«B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS) EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO IN VIVO**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 486 sobre el ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* tiene por objeto determinar sustancias de ensayo que inducen la reparación del ADN en los hepatocitos de animales tratados (1) (2) (3) (4).

El presente ensayo *in vivo* constituye un método de investigación de los efectos genotóxicos de los productos químicos en el hígado y sirve para detectar lesiones en el ADN y su posterior reparación en las células hepáticas. El hígado suele ser el lugar donde más se metabolizan los compuestos absorbidos y por ello constituye el órgano más apropiado para la detección de lesiones del ADN *in vivo*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo no llega al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

La síntesis de ADN no programada (UDS) se determina midiendo la incorporación de nucleósidos marcados en células que no se encuentran en la fase S de síntesis programada de ADN. La técnica más empleada consiste en determinar la captación de timidina tritiada (^3H -TdR) por autorradiografía. Para los ensayos de UDS *in vivo* es preferible utilizar hígados de rata. También pueden emplearse otros tejidos, si bien no se tratan en las presentes directrices.

La detección de una respuesta de UDS depende del número de bases del ADN eliminadas y repuestas en el sitio de la lesión. De ahí que el ensayo de UDS sea particularmente útil para detectar la reparación de secuencias largas (20 a 30 bases; secuencias largas de reparación) inducida por una sustancia. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo para detectar la reparación de secuencias cortas (1 a 3 bases; secuencias cortas de reparación) es mucho menor. Por otra parte, las alteraciones mutagénicas pueden deberse a una falta de reparación o a una reparación o replicación erróneas de las lesiones del ADN. La magnitud de la respuesta de UDS no es indicativa de la fidelidad del proceso de reparación. Además de ello, es posible que un mutágeno reaccione con el ADN, pero que la lesión de éste no se repare por un mecanismo de reparación de excisión. La falta de información específica sobre la actividad mutagénica que caracteriza al ensayo UDS se ve compensada por su sensibilidad potencial, ya que detecta los efectos en todo el genoma.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Células en reparación: células con un número neto de granulaciones nucleares (NGN) superior a un número preestablecido que el laboratorio donde se realiza el ensayo ha de fundamentar.

Número neto de granulaciones nucleares (NGN): medida cuantitativa de la síntesis de ADN no programada en las células por autorradiografía; se calcula restando el número medio de granulaciones citoplasmáticas (GC) en las zonas citoplasmáticas equivalentes al núcleo del número de granulaciones nucleares (GN): $\text{NGN} = \text{GN} - \text{GC}$. Primero se calcula el NGN de cada célula y después el correspondiente a todo un cultivo o a cultivos paralelos, etc.

Síntesis de ADN no programada (UDS): síntesis de reparación de ADN tras la excisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* detecta la síntesis de reparación del ADN tras la excisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos. El ensayo suele fundarse en la incorporación de ^3H -TdR al ADN de hepatocitos de los cuales una escasa proporción se encuentra en la fase S del ciclo celular. La incorporación de ^3H -TdR suele determinarse por autorradiografía, ya que esta técnica no es tan sensible a las interferencias debidas a las células en fase S como lo es, por ejemplo, el recuento por centelleo de líquidos.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. Preparación

1.4.1.1. Selección de la especie animal

Si bien suelen emplearse ratas, pueden utilizarse otras especies de mamíferos apropiadas. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. Alojamiento y alimentación de los animales

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60%.

1.4.1.3. Preparación de los animales

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

1.4.1.4. Preparación de la sustancia de ensayo

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible, conservarlas.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Disolvente o vehículo

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. Controles

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada parte independiente del experimento. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos se emplearán sustancias de las que se sepa que inducen la síntesis de ADN no programada cuando se administran en dosis con las que se prevé un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Los controles positivos que requieran activación metabólica se realizarán con dosis que provoquen una respuesta moderada (4). Las dosis del control positivo pueden ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Período de muestreo	Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Corto (2 a 4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Largo (12 a 16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. La sustancia del control positivo puede administrarse por una vía distinta de la de la sustancia de ensayo.

1.5. PROCEDIMIENTO**1.5.1. Número y sexo de los animales**

El número de animales deberá decidirse tomando en consideración la variación biológica natural de la respuesta al ensayo. Cada lote estará constituido al menos por tres animales analizables. Si se dispone de una base de datos de controles históricos importante, bastarán uno o dos animales para los lotes de los controles negativos y positivos realizados en paralelo.

Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo, preferiblemente en machos. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. Pauta de tratamiento

Las sustancias de ensayo suelen administrarse en una sola vez.

1.5.3. Dosis

En principio, se administran al menos dos dosis distintas. Se entiende por "dosis máxima" la que produce tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Por lo general, la dosis inferior es del 50% al 25% de la dosis máxima.

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal.

La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad hepática (por ejemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4. Ensayo límite

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afin, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. Administración de las dosis

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. La vía intraperitoneal no está indicada, ya que podría exponer el hígado a la sustancia de ensayo directamente en lugar de a través del sistema circulatorio. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a éste. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. Preparación de los hepatocitos

Se extraen hepatocitos de los animales tratados, por lo general de 12 a 16 horas después de la administración de la sustancia de ensayo. Suele ser necesaria otra toma previa (generalmente de 2 a 4 horas después del tratamiento), salvo que a las 12-16 horas haya una respuesta positiva clara. No obstante, pueden aplicarse otros períodos de muestreo, si así lo justifican los datos toxicocinéticos.

Los cultivos de hepatocitos de mamífero a corto plazo se realizan perfundiendo el hígado *in situ* con colagenasa y dejando que los hepatocitos recién disociados se adhieran a una superficie adecuada. La viabilidad de los hepatocitos de los animales del control negativo ha de ser del 50% como mínimo (5).

1.5.7. Determinación de la síntesis de ADN no programada

Los hepatocitos de mamífero recién aislados se incuban en un medio con ^3H -TdR durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 3 a 8 horas. Al término de la incubación, se retiran las células del medio y pueden entonces incubarse en otro medio con un exceso de timidina sin tratar con el fin de reducir la radiactividad no incorporada (*cold chase*). A continuación, se aclaran las células, se fijan y se tiñen. Esta segunda incubación puede no ser necesaria si la primera ha sido más larga. Se bañan los portaobjetos en una emulsión autorradiográfica, se exponen en la oscuridad (por ejemplo, refrigerados, de 7 a 17 días), se revelan y tiñen y se cuentan los granos de plata expuestos. Se preparan dos o tres portaobjetos por animal.

1.5.8. Análisis

Las preparaciones han de contener un número suficiente de células de morfología normal para que la evaluación de la síntesis de ADN no programada sea significativa. Se observan las preparaciones al microscopio en busca de signos de citotoxicidad manifiesta (por ejemplo, picnosis, índice reducido de marcado radiactivo, etc.).

Se codifican los portaobjetos antes del recuento de granulaciones. Por lo general, se cuentan 100 células por animal, en dos portaobjetos como mínimo. El recuento de menos de 100 células por animal deberá estar debidamente justificado. Si bien los núcleos en fase S no se consideran en el recuento de granulaciones, puede registrarse la proporción de células en fase S.

Se determinará con métodos apropiados la cantidad de ^3H -TdR incorporada en los núcleos y el citoplasma de las células con morfología normal, revelada por el depósito de granos de plata.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se proporcionarán los datos de cada portaobjetos y de cada animal. Se resumirán todos los datos en forma de tabla. Se calculará el número neto de granulaciones nucleares (NGN) por célula, por animal y por dosis y tiempo restando el número de GC del de GN. Si se cuentan las células en reparación, se motivará el criterio aplicado para definir las "células en reparación", que deberá fundarse en datos relativos a controles históricos negativos o realizados en paralelo al ensayo. Los resultados numéricos pueden evaluarse por medio de métodos estadísticos, que deberán seleccionarse y justificarse antes de llevar a cabo el estudio.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Entre los criterios para determinar si una respuesta es positiva o negativa se encuentran los siguientes:

- respuesta positiva:
- i) el NGN es superior a un valor preestablecido fundado en datos de controles históricos obtenidos en el laboratorio, o
 - ii) el NGN supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo;
- respuesta negativa:
- i) el NGN no supera el umbral correspondiente a controles históricos, o
 - ii) el NGN no supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo.

Debe considerarse la importancia biológica de los resultados. Se tomarán en consideración, por ejemplo, la variabilidad entre animales, la relación dosis-respuesta y la citotoxicidad. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

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 de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca lesiones del ADN en los hepatocitos de mamífero *in vivo* que pueden repararse por síntesis de ADN no programada *in vitro*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca lesiones del ADN detectables mediante este ensayo.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo pase al torrente circulatorio o llegue específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

- motivación de la elección del vehículo,
- solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

- especie y cepa utilizadas,
- número, edad y sexo de los animales,
- procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,
- peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

- controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),
- datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,
- fundamento de la selección de la dosis,
- preparación de la sustancia de ensayo,
- administración de la sustancia de ensayo,
- fundamento de la elección de la vía de administración,
- métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,
- conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,
- calidad de los alimentos y el agua,
- descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,
- métodos de determinación de la toxicidad,
- métodos de preparación y cultivo de los hepatocitos,
- técnica autorradiográfica utilizada,

- número de portaobjetos preparados y de células sometidas a recuento,
- criterios de evaluación,
- criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

- media de granulaciones nucleares, granulaciones citoplasmáticas y granulaciones nucleares netas por portaobjetos, animal y lote,
- relación dosis-respuesta, cuando sea posible,
- evaluación estadística, si se ha realizado,
- signos de toxicidad,
- datos de los controles negativos (disolvente o vehículo) y positivos realizados en paralelo,
- datos de controles históricos negativos (disolvente o vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar,
- número de "células en reparación", si se ha determinado,
- número de células en fase S, si se ha determinado,
- viabilidad de las células.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553-562.

ANEXO B- 8

•B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (CEVMA, Centro Común de Investigación, Comisión Europea) ha considerado científicamente válidos dos ensayos *in vitro* de corrosividad cutánea: el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata [*the rat skin transcutaneous electrical resistance (TER)*] y un ensayo que emplea un modelo de piel humana (1) (2) (3). El estudio de validación del CEVMA demostró que ambos ensayos podían discriminar de manera fiable entre agentes corrosivos y no corrosivos cutáneos conocidos. Además, el protocolo del ensayo basado en un modelo de piel humana permitió una distinción correcta entre grados de efectos corrosivos (agentes corrosivos potentes conocidos, R35, y otros agentes corrosivos cutáneos, R34) (2). A continuación, se dan las descripciones y procedimientos de ambos ensayos, cuya elección depende de las necesidades concretas y las preferencias del usuario.

Véase también la introducción general de la parte B.

1.2. Definiciones

Corrosión cutánea: producción de daños tisulares irreversibles en la piel tras la aplicación de una sustancia de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

No se especifica ninguna pero véanse los puntos 1.5.3.4 y 1.7.2.3.

1.4. Principio del método — Ensayo TER en piel de rata

La sustancia de ensayo se aplica durante 24 horas a las superficies epidérmicas de discos cutáneos tomados de la piel de ratas jóvenes sacrificadas sin causar sufrimientos. Las sustancias corrosivas se caracterizan por su capacidad de producir una pérdida de la integridad normal de la capa córnea y de la función de barrera. Esta pérdida se mide como reducción de la TER inherente por debajo de un umbral (5 k Ω) (4) (5). Las sustancias irritantes y no irritantes no reducen la TER por debajo del umbral. Para los surfactantes y las sustancias orgánicas neutras [véase la definición en la referencia (6)] puede incorporarse al procedimiento de ensayo un paso consistente en la fijación de un colorante con el fin de reducir el número de falsos positivos que se obtienen concretamente con estos tipos químicos (2) y (7).

1.5. Descripción del método — Ensayo TER en piel de rata

1.5.1. Animales

Para la preparación de los discos de piel se necesitan ratas jóvenes (20-23 días) (Wistar o una cepa comparable). El pelo dorsal y de los costados se rasura con cuidado utilizando una maquinilla para animales pequeños. A continuación se lavan los animales enjugándolos cuidadosamente al mismo tiempo que se sumerge la zona en una solución antibiótica (que contenga, por ejemplo, estreptomycin, penicilina, cloranfenicol y anfotericina en concentraciones que sean efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano). Al tercer o cuarto día después del primer lavado se lavan otra vez los animales con antibióticos y se usan dentro de los tres días siguientes (los animales no pueden tener más de 31 días de edad para la preparación de piel).

1.5.2. Preparación de los discos cutáneos

Se sacrifican los animales sin sufrimientos. A continuación se retira la piel dorsal de cada animal y se le quita la grasa separándola de la piel cuidadosamente. Se coloca la piel en el extremo de un tubo de PTFE (politetrafluorotileno), comprobando que la superficie epidérmica esté en contacto con el mismo. Se coloca a presión un anillo de goma en el extremo del tubo para mantener la piel en su sitio y se recorta el tejido sobrante. En la figura 1 se dan las dimensiones del anillo y del tubo. Después se sella con cuidado el anillo de goma al extremo del tubo de PTFE con vaselina. El tubo se sujeta mediante una pinza de muelle dentro de una cámara receptora que contiene una solución de sulfato de magnesio (154 mM) (figura 2).

1.5.3. Procedimiento

1.5.3.1. Aplicación del material de ensayo

Dentro del tubo se aplican a la superficie epidérmica sustancias líquidas de ensayo (150 μ l) (figura 2). Cuando se prueban materias sólidas se aplica al disco una cantidad suficiente del sólido de tal manera que quede cubierta toda la superficie de epidermis. A continuación se vierte encima del sólido agua desionizada (150 μ l) y se agitan suavemente los tubos. Las sustancias de ensayo deben tener el máximo contacto posible con la piel. Para algunos sólidos este contacto máximo puede conseguirse calentando hasta 30 °C para fundir la sustancia de ensayo o moliéndola para producir un polvo o un granulado.

Para cada sustancia de ensayo se utilizan tres discos cutáneos. La sustancia de ensayo se aplica durante 24 horas (véase también el punto 1.5.3.4) y se elimina lavando bajo el chorro de agua del grifo a 30 °C hasta que no pueda eliminarse más materia. La eliminación de sustancias de ensayo que se hayan solidificado en el tubo puede facilitarse mediante un lavado a chorro con agua caliente a aproximadamente 30 °C.

1.5.3.2. Mediciones de la TER

La TER se mide mediante un puente de corriente alterna y baja tensión (por ejemplo, AIM 401 o 6401, o equivalente). Antes de medir la resistencia eléctrica, se reduce la tensión superficial de la piel añadiendo la cantidad suficiente de etanol al 70% para cubrir la epidermis. Después de unos segundos se quita el etanol dando la vuelta al tubo y entonces se hidrata el tejido aplicando 3 ml de una solución de sulfato de magnesio (154 mM). Los electrodos del puente se colocan a ambos lados del disco cutáneo para medir la resistencia en k Ω /disco (figura 2). En la figura 1 se dan las dimensiones de los electrodos y la longitud del electrodo expuesta por debajo de las pinzas de cocodrilo. La pinza que sujeta el electrodo interior (grueso) se coloca encima del tubo de PTFE durante la medición de la resistencia para asegurarse de que la longitud del electrodo que queda sumergida en la solución de sulfato de magnesio es constante. El electrodo exterior (delgado) se coloca dentro de la cámara receptora de manera que esté en contacto con el fondo de la misma. La distancia entre el fondo de la pinza de muelle y el fondo del tubo de PTFE se mantendrá constante (figura 1), ya que esta distancia afecta al valor de la resistencia obtenido.

Téngase en cuenta que si el valor de la resistencia medido es superior a 20 k Ω , puede deberse a la sustancia de ensayo que recubre la superficie epidérmica del disco cutáneo. Puede intentarse la eliminación de este recubrimiento, por ejemplo, sellando el tubo de PTFE con el pulgar cubierto de un guante y agitándolo aproximadamente diez segundos; se tira la solución de sulfato de magnesio y se repite la medición de la resistencia con otra solución de sulfato de magnesio.

Los resultados medios de la TER se aceptan a condición de que los valores de control positivos y negativos en paralelo queden dentro de intervalos aceptables para el método. A continuación se dan las sustancias de control propuestas y sus intervalos de resistencia aceptables para la metodología y el instrumental:

Control	Sustancia	Intervalo de resistencia (k Ω)
Positivo	10 M de ácido clorhídrico (36%)	0,5-1,0
Negativo	Agua destilada	10-25

1.5.3.3. Procedimiento modificado para surfactantes y sustancias orgánicas neutras

Si los valores TER de las sustancias de ensayo que sean surfactantes o sustancias orgánicas neutras son inferiores o iguales a 5 k Ω , puede hacerse en los tejidos una evaluación de la penetración del colorante. Este procedimiento determinará si los resultados son falsos positivos (2).

1.5.3.3.1. Aplicación y eliminación del colorante sulforodamina B

Después del tratamiento inicial con la sustancia de ensayo, se aplicarán 150 ml de una dilución al 10 % (p/v) de colorante sulforodamina B en agua destilada sobre la superficie epidérmica de cada disco cutáneo durante dos horas. A continuación, los discos se lavan a chorro con agua del grifo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 segundos para eliminar el colorante excedente o sin fijar. Cada disco cutáneo se retira cuidadosamente del tubo de PTFE y se coloca en un frasco (por ejemplo, un frasco de cristal de centelleo de 20 ml) que contenga agua desionizada (8 ml). Los frascos se agitan suavemente durante cinco minutos para eliminar el colorante excedente o sin fijar que haya quedado. Este procedimiento de aclarado se repite a continuación, después de lo cual se retiran los discos cutáneos y se colocan en frascos que contengan 5 ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 30 % (p/v) en agua destilada y se dejan incubar una noche a 60 °C. Después de la incubación, se retira y desecha cada disco cutáneo y la solución restante se centrifuga 8 minutos a 21 °C (fuerza centrífuga relativa ~ 175). Luego, se diluye 1 a 5 (v/v) [es decir, 1 ml + 4 ml] una muestra de 1 ml del sobrenadante con dodecilsulfato sódico al 30 % (p/v) en agua destilada. La densidad óptica (DO) de la solución se mide a aproximadamente 565 nm.

1.5.3.3.2. Cálculo del contenido en colorante

El contenido en colorante sulforodamina B por disco se calcula a partir de los valores DO (coeficiente de extinción molar del colorante sulforodamina B a 565 nm = $8,7 \times 10^4$; peso molecular = 580). El contenido en colorante sulforodamina B se determina para cada disco cutáneo y luego se calcula un contenido medio de colorante para los ensayos repetidos. Los resultados medios de fijación del colorante se aceptan a condición de que los valores de control en paralelo queden dentro de intervalos aceptables para el método. A continuación se dan los intervalos de contenido en colorante aceptables que se proponen para las sustancias de control y para la metodología y el instrumental:

Control	Sustancia	Intervalo del contenido en colorante ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
Positivo	10 M de ácido clorhídrico (36 %)	40-100
Negativo	Agua destilada	15-35

1.5.3.4. Información complementaria

Pueden aplicarse también sustancias de ensayo a los discos cutáneos durante períodos más cortos (por ejemplo, 2 horas) para identificar aquellos materiales que sean fuertemente corrosivos. Sin embargo, en el estudio de validación, se halló que el ensayo TER sobrestimaba el potencial corrosivo de varias sustancias químicas de ensayo después de su aplicación a los discos cutáneos durante 2 horas (2), aunque permitía la correcta identificación de sustancias corrosivas y no corrosivas después de una aplicación de 24 horas.

Las propiedades y dimensiones del instrumental de ensayo y el procedimiento experimental utilizado pueden influir en los valores TER obtenidos. El umbral de corrosión de $5 \text{ k}\Omega$ se determinó a partir de datos obtenidos con el instrumental y el procedimiento concretos descritos en este método. Si las condiciones de ensayo se modifican de manera significativa, pueden aplicarse diferentes umbrales y valores de control. Por tanto, se recomienda que la metodología y el umbral de resistencia se calibren probando una serie de sustancias de referencia elegidas entre los productos químicos utilizados en el estudio de validación (3).

1.6. Principio del método — Ensayo con modelo de piel humana

El material de ensayo se aplica tópicamente durante 4 horas a un modelo tridimensional de piel humana que comprende una epidermis reconstruida con una capa córnea funcional. Los materiales corrosivos se caracterizan por su capacidad de producir una disminución de la viabilidad celular (determinada, por ejemplo, utilizando el ensayo de reducción del MTT) por debajo de determinados umbrales en períodos de exposición especificados. El principio del ensayo parte de la hipótesis de que los productos químicos corrosivos son los que pueden penetrar la capa córnea (por difusión o erosión) y son suficientemente citotóxicos para provocar la muerte de las células en las capas celulares subyacentes.

1.7. Descripción del método — Ensayo con modelo de piel humana

1.7.1. Modelos de piel humana

Los modelos de piel humana pueden tener diferentes orígenes pero tienen que cumplir determinados criterios. El modelo debe tener una capa córnea funcional con una capa subyacente de células vivas. La función de barrera de la capa córnea debe ser adecuada, lo cual puede ponerse de manifiesto demostrando la resistencia del modelo a la citotoxicidad tras la aplicación de sustancias conocidas como citotóxicas pero que normalmente no atraviesan la capa córnea. Debe mostrarse que el modelo da resultados reproducibles en condiciones experimentales definidas.

La viabilidad de las células vivas del modelo debe ser suficientemente alta para discriminar bien entre las sustancias de controles positivos y negativos. La viabilidad celular (por ejemplo, medida por la reducción del MTT, es decir, un valor DO) tras la exposición a la sustancia del control negativo debe quedar dentro de límites aceptables para el modelo en cuestión. De la misma manera, los valores de viabilidad celular con la sustancia del control positivo (en relación con los del control negativo) deben quedar dentro de límites especificados y, lo que es más importante, hay que demostrar que el modelo de predicción utilizado cumple normas de validación internacionales (2).

1.7.2. Procedimiento

1.7.2.1. Aplicación de la sustancia de ensayo

Para materiales líquidos, debe aplicarse una cantidad de sustancia de ensayo suficiente para cubrir la superficie cutánea (un mínimo de $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$). Para los materiales sólidos, tiene que aplicarse suficiente cantidad de sustancia para cubrir la piel y, a continuación, debe humedecerse para asegurar un buen contacto con la piel; cuando convenga, deberán molerse los sólidos para transformarlos en polvo antes de su aplicación. Debe mostrarse que el método de aplicación es adecuado para una amplia gama de tipos químicos (2). Al final del período de exposición, el material de ensayo debe lavarse cuidadosamente de la superficie de la piel con una solución salina.

1.7.2.2. Medición de la viabilidad celular

Para medir la viabilidad celular puede emplearse cualquier método cuantitativo validado. El ensayo utilizado más frecuentemente es la reducción del MTT, que se ha comprobado que da resultados exactos y reproducibles en diferentes laboratorios (2). El disco cutáneo se coloca en una solución de MTT de $0,3 \text{ mg/ml}$ a $20\text{-}28^\circ\text{C}$ durante 3 horas. A continuación se extrae el formazano azul precipitado (extracción del disolvente) y se mide la concentración de formazano determinando la DO a una longitud de onda entre 545 y 595 nm.

1.7.2.3. Información complementaria

El modelo de piel utilizado y el protocolo exacto del tiempo de exposición y los procedimientos de lavado, etc., tendrán un efecto importante en los resultados de la viabilidad celular. Se recomienda que la metodología y el modelo de predicción se calibren probando una serie de sustancias de referencia elegidas entre los productos químicos utilizados en el estudio de validación del CEVMA (3). Es crucial haber comprobado que el método utilizado es reproducible dentro y entre laboratorios para una amplia gama de productos químicos con arreglo a normas internacionales. Como mínimo, el método debe cumplir los criterios de validez científica definidos previamente (2) y los resultados de este estudio de validación deben publicarse en una revista científica que los someta a una revisión *inter pares*.

2. RESULTADOS

2.1. Tratamiento de los resultados

2.1.1. Ensayo TER en piel de rata

Los valores de resistencia ($k\Omega$) para la sustancia de ensayo, los controles positivos y negativos y los posibles productos químicos de referencia deben darse en forma de tabla, incluyendo los datos de los experimentos repetidos, los valores medios y la clasificación derivada.

2.1.2. Ensayo con modelo de piel humana

Los valores DO y los datos sobre viabilidad celular calculados en porcentaje para la sustancia de ensayo, los controles positivos y negativos y los posibles productos químicos de referencia deben darse en forma de tabla, incluyendo los datos de los experimentos repetidos, los valores medios y la clasificación derivada.

2.2. Evaluación e interpretación de los resultados

2.2.1. Ensayo TER sobre piel de rata

Si el valor medio TER obtenido para la sustancia de ensayo es superior a 5 $k\Omega$, la sustancia no es corrosiva. Si el valor TER es inferior o igual a 5 $k\Omega$, y la sustancia de ensayo no es un surfactante ni una sustancia orgánica neutra, la sustancia es corrosiva.

Para los surfactantes o sustancias orgánicas neutras que den valores TER inferiores o iguales a 5 $k\Omega$, puede evaluarse la penetración de un colorante. Si el contenido medio de colorante en el disco es superior o igual al contenido medio de colorante en el disco del control positivo de HCl al 36 % obtenido en paralelo, la sustancia de ensayo es un positivo verdadero y, por tanto, es corrosiva. Si el contenido medio de colorante en el disco es inferior al contenido medio de colorante en el disco del control positivo de HCl al 36 % obtenido en paralelo, la sustancia de ensayo da un falso positivo y, por tanto, no es corrosiva.

2.2.2. Ensayo con modelo de piel humana

El valor DO del control negativo representa el 100 % de viabilidad celular; de ahí que los valores DO obtenidos para cada muestra de ensayo puedan utilizarse para calcular un porcentaje de viabilidad respecto al control negativo. El porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir entre sustancias de ensayo corrosivas y no corrosivas (o discriminar entre diferentes tipos de sustancias corrosivas) tiene que definirse claramente en el modelo de predicción antes de validar el método y el posterior estudio de validación debe demostrar que el valor que se utiliza para separar es adecuado (2).

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- datos de identificación, naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas; también debe darse información semejante para las sustancias de referencia, si se utilizan.

Condiciones del ensayo:

- particularidades del procedimiento de ensayo empleado,
- descripción y justificación de posibles modificaciones.

Resultados:

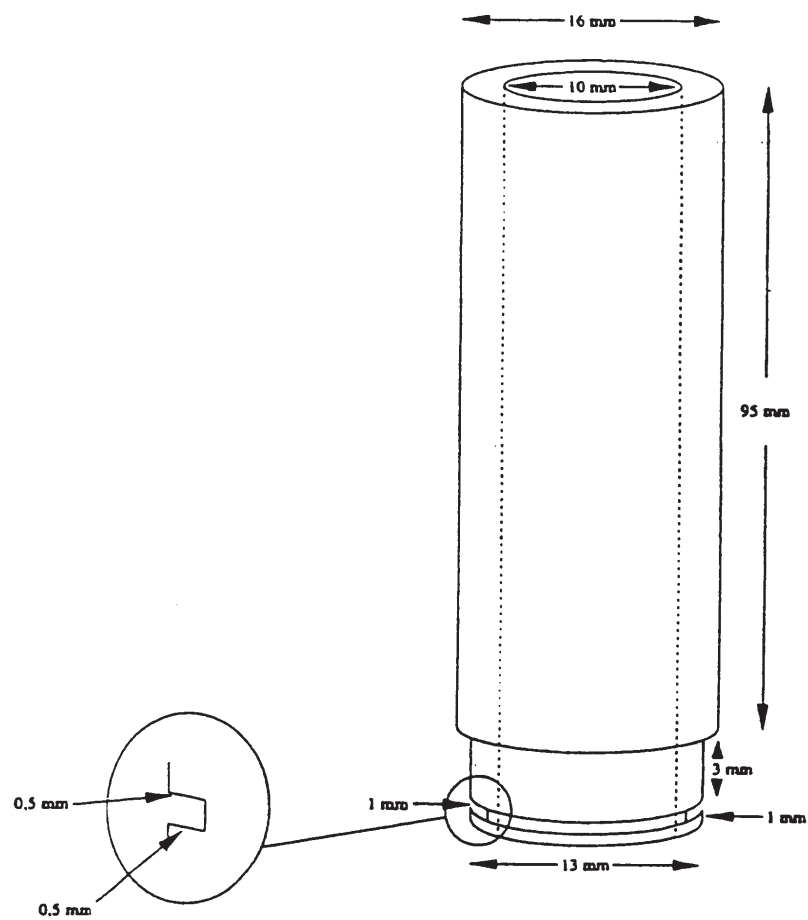
- tabulación de los valores de resistencia (ensayo TER) o porcentajes de viabilidad celular (ensayo con modelo de piel humana) del material de ensayo, controles positivos y negativos y posibles productos químicos de referencia, incluyendo datos sobre experimentos repetidos y valores medios,
- descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados.**Conclusiones.****4. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, pp. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, pp. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, pp. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA 26, pp. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Poncet, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, ATLA 23, pp. 219-255.

Figura 1

Dimensiones del tubo de PTFE



Dimensiones de los electrodos

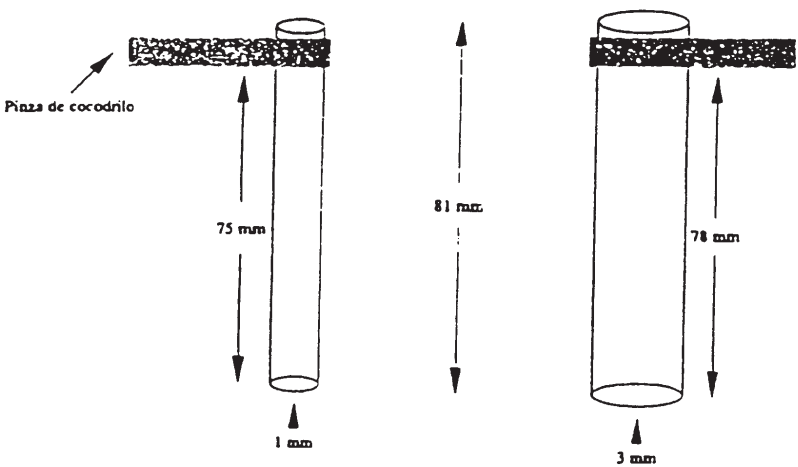
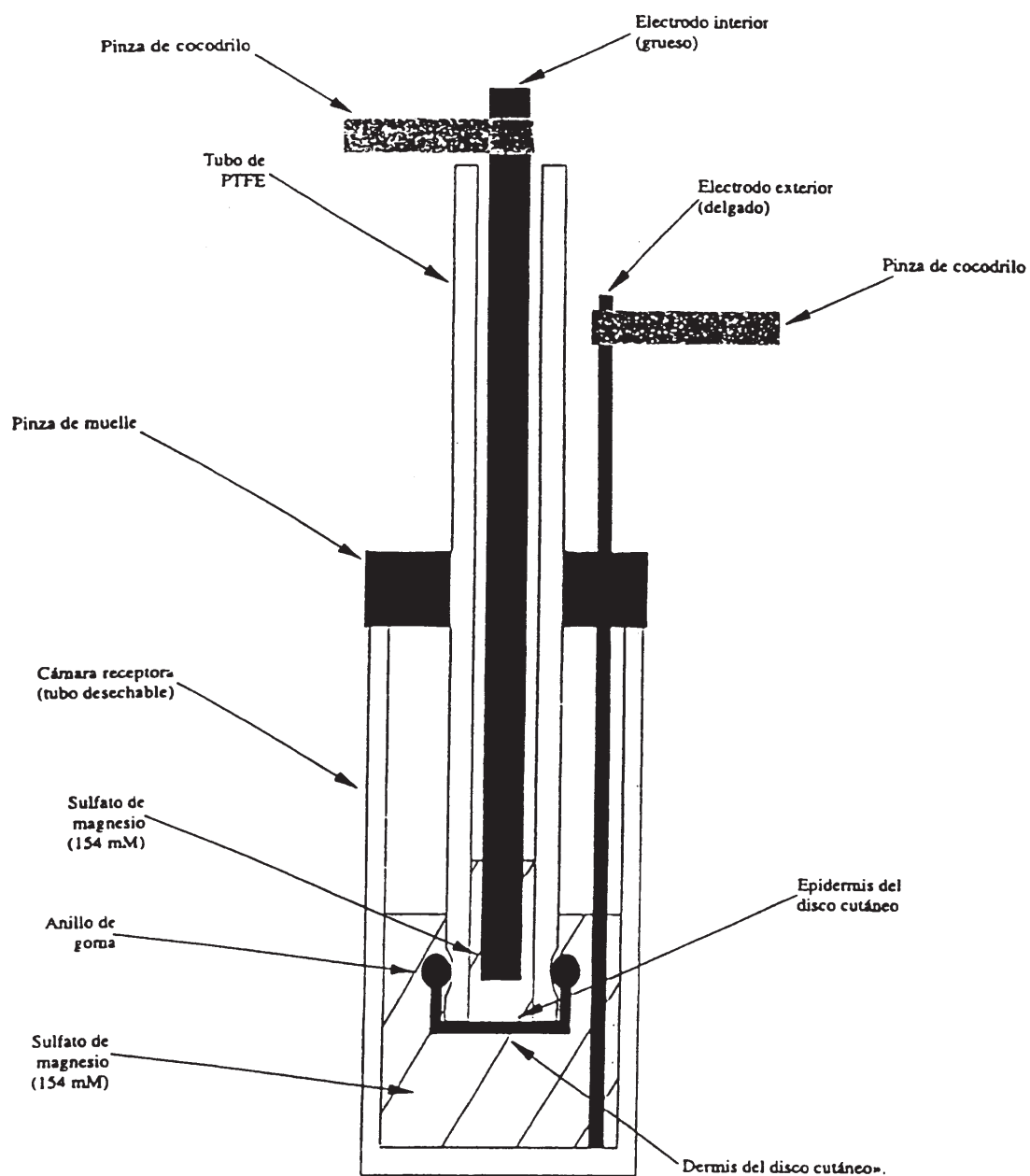


Figura 2

Instrumental para el ensayo TER en piel de rata



ANEXO B- 9

B.41. FOTOTOXICIDAD — ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTODO

1.1. Introducción

La fototoxicidad es una reacción tóxica que se produce tras la exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

La información que proporciona el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU sirve para determinar el potencial fototóxico de una sustancia de ensayo, es decir, para saber si puede entrañar peligros o no en caso de exposición a las radiaciones UV y de luz visible.

Dado que el parámetro toxicológico que se pone de manifiesto con el ensayo *in vitro* es la fotocitotoxicidad, provocada por la acción combinada de una sustancia y de la luz, el ensayo permite determinar compuestos que resultan fototóxicos *in vivo* tras su administración sistémica y difusión a la piel, así como compuestos que resultan fotoirritantes tras su aplicación tópica en la piel.

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU ha sido elaborado y validado en el marco de un proyecto conjunto UE/COLIPA entre 1992 y 1997 (1) (2) (3), con el fin de establecer un método *in vitro* válido para sustituir a los diversos ensayos *in vivo* empleados. En 1996 se recomendó en un taller de la OCDE un enfoque secuencial de ensayo *in vitro* para evaluar la fototoxicidad (4).

Los resultados del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU se han comparado con los efectos de fototoxicidad/fotoirritación aguda *in vivo* en animales y seres humanos, lo cual ha puesto de manifiesto que el ensayo proporciona una excelente predictividad de dichos efectos. El ensayo no está diseñado para detectar otros efectos adversos de la acción combinada de las sustancias químicas y la luz, como pueden ser la fotogenotoxicidad, la fotoalergia y la fotocarcinogenicidad, si bien muchas sustancias químicas que presentan esas propiedades darán un resultado positivo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU. Además de ello, el ensayo tampoco permite evaluar la potencia fototóxica.

El apéndice recoge un enfoque secuencial de ensayo de la fototoxicidad de sustancias químicas.

1.2. Definiciones

Irradiancia: intensidad de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, medida en W/m^2 o mW/cm^2 .

Dosis de luz: cantidad (= intensidad $\times$ tiempo) de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, expresada en julios (= $\text{W} \times \text{s}$) por unidad de superficie, por ejemplo J/m^2 o J/cm^2 .

Longitud de onda de la luz UV: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm) [designaciones recomendadas por la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage)]. También se emplean otras designaciones: la separación entre UVB y UVA suele situarse a 320 nm y las radiaciones UVA pueden subdividirse en UV-A1 y UV-A2, con una separación a 340 nm aproximadamente.

Viabilidad celular: parámetro que mide la actividad total de una población celular (por ejemplo, captación del colorante vital rojo neutro por los lisosomas celulares), que, según el efecto que se mida y el tipo de ensayo realizado, corresponde al número total y/o la viabilidad de las células.

Viabilidad celular relativa: viabilidad celular respecto a la de los controles negativos (disolvente) que se toman a lo largo de todo el procedimiento de ensayo (+UV o -UV), pero no se tratan con la sustancia de ensayo.

Modelo de predicción: algoritmo utilizado para transformar los resultados de un ensayo de toxicidad en una predicción de potencial tóxico. En las presentes directrices de ensayo, pueden utilizarse el PIF y el MPE para transformar los resultados del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU en una predicción del potencial fototóxico.

PIF (Photo Irritation Factor-Factor de fotoirritación): factor que se obtiene comparando dos concentraciones citotóxicas igualmente eficaces (EC_{50}) de la sustancia de ensayo en ausencia (-UV) y en presencia (+UV) de una irradiación no citotóxica con UVA/luz visible.

MPE (Mean Photo Effect-Fotoefecto medio): nueva medida derivada de un análisis matemático del trazado completo de dos curvas de concentración-respuesta obtenidas en ausencia (-UV) y en presencia (+UV) de una irradiación no citotóxica con UVA/luz visible.

Fototoxicidad: reacción tóxica aguda que se produce tras la primera exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

Fotoirritación: subcategoría del término "fototoxicidad", empleada para describir únicamente las reacciones fototóxicas que se producen en la piel tras la exposición (aplicación tópica o administración oral) a sustancias químicas. Dichas reacciones fototóxicas provocan siempre daños celulares inespecíficos (del tipo eritema solar).

Fotoalergia: reactividad inmunológica adquirida, que no se produce tras la primera exposición a la sustancia química y a la luz, y que requiere un período de inducción de una o dos semanas antes de que se manifieste la reactividad cutánea.

Fotogenotoxicidad: reacción genotóxica observada para un parámetro genético, que se produce tras la exposición de las células a una dosis no genotóxica de luz UV/visible y a una sustancia química no genotóxica.

Fotocarcinogenicidad: carcinogenicidad inducida por la exposición repetida a la luz y a una sustancia química. Se emplea el término "fotocarcinogénesis" cuando el efecto carcinógeno de las radiaciones UV se ve acrecentado por la exposición a una sustancia química.

1.3. Sustancias de referencia

Además de la clorpromacina empleada para el control positivo, que ha de someterse a ensayo en paralelo en cada caso, se recomienda utilizar como sustancias de referencia para el ensayo de fototoxicidad 3T3 NRU un subconjunto de las sustancias químicas empleadas para dicho ensayo en las pruebas interlaboratorios (1) (3) (13).

1.4. Consideraciones iniciales

Se ha señalado que numerosos tipos de sustancias químicas producen efectos fototóxicos (5) (6) (7) (8). Su única característica en común es la capacidad de absorber la energía luminosa de la luz solar. Con arreglo a la primera ley de la fotoquímica (ley de Grotthaus-Draper), para que se produzca fotorreacción, es necesaria la absorción de una cantidad suficiente de quanta de luz. Por tanto, antes de plantearse realizar un ensayo biológico conforme a las presentes directrices, debe determinarse el espectro de absorción de rayos UV/luz visible de la sustancia de ensayo (por ejemplo según las directrices de ensayo 101 de la OCDE). Si el coeficiente de extinción/absorción molar es inferior a $10 \text{ litro} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, la sustancia carece de potencial fotorreactivo y no es preciso someterla al ensayo de fototoxicidad in vitro 3T3 NRU ni a ningún otro ensayo biológico de efectos fotoquímicos adversos (apéndice I).

1.5. Principio del método

Se han descrito cuatro mecanismos mediante los cuales la absorción de luz por un cromóforo (químico) puede dar lugar a una reacción fototóxica (7) y todos ellos provocan daños celulares. Así pues, el ensayo de fototoxicidad in vitro 3T3 NRU se basa en la comparación de la citotoxicidad de una sustancia cuando se somete a ensayo exponiéndola a una dosis no citotóxica de radiación UVA/luz visible y sin exponerla. La citotoxicidad en este ensayo se expresa como la disminución, ligada a la concentración, de la captación del colorante vital rojo neutro (*Neutral Red* - NR (9)) 24 horas después de la administración de la sustancia de ensayo y la irradiación.

Se mantienen en cultivo células Balb/c 3T3 durante 24 horas hasta que se formen monocapas. Por cada sustancia de ensayo se preincuban durante 1 hora dos placas de 96 pocillos con ocho concentraciones distintas de la sustancia de ensayo. A continuación, una de las placas se expone a una dosis no citotóxica de radiación UVA/luz visible de 5 J/cm^2 UVA (experimento +UV) y la otra se mantiene en la oscuridad (experimento -UV). El medio de tratamiento se sustituye después por un medio de cultivo en las dos placas y, tras otras 24 horas de incubación, se determina la viabilidad celular mediante el análisis de captación del rojo neutro (*Neutral Red Uptake* - NRU) durante 3 horas. Se calcula, para cada una de las ocho concentraciones de ensayo, la viabilidad celular relativa, expresada en porcentaje de los controles negativos no tratados. Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las reacciones a las distintas concentraciones obtenidas en presencia (+UV) y en ausencia (-UV) de irradiación, por lo general al nivel EC_{50} , es decir, la concentración que inhibe la viabilidad celular en un 50 % respecto a los controles sin tratar.

1.6. Criterios de calidad

Sensibilidad de las células a las radiaciones UVA-Datos de referencia: debe comprobarse periódicamente la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA. Se siembran las células a la densidad empleada en el ensayo de fototoxicidad in vitro 3T3 NRU y al día siguiente se irradian con dosis de 1 a 9 J/cm^2 de radiación UVA. Un día después, se determina la viabilidad celular mediante el ensayo NRU. Las células cumplen los criterios de calidad si, tras la irradiación con 5 J/cm^2 UVA, su viabilidad es superior o igual al 80 % de la viabilidad de los controles mantenidos en la oscuridad. Con la dosis superior de radiación UVA (9 J/cm^2), la viabilidad debe ser, al menos, igual al 50 % de la de los controles mantenidos en la oscuridad. Esta comprobación debe repetirse aproximadamente cada 10 pasos celulares.

Sensibilidad de las células de los controles negativos a las radiaciones UVA-Ensayo en curso: el ensayo cumple los criterios de calidad si los controles negativos [células en una solución salina equilibrada de Earl (*Earl's Balanced Salt Solution*-EBSS) con o sin 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) o 1 % de etanol (EtOH)] en el experimento + UVA presentan una viabilidad superior o igual al 80 % de la de las células no irradiadas en el mismo disolvente del experimento realizado en paralelo en la oscuridad (-UVA).

Viabilidad de los controles negativos: la densidad óptica absoluta ($OD_{540 \text{ NRU}}$) medida en el extracto NR de los controles negativos indica si las 1×10^4 células sembradas por pocillo han crecido en un tiempo de generación normal durante los dos días del ensayo. Éste se ajusta a los criterios de aceptación si la densidad óptica media ($OD_{540 \text{ NRU}}$) de los controles no tratados es $\geq 0,2$.

Control positivo: por cada ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU, debe someterse a ensayo en paralelo una sustancia fototóxica conocida. Se recomienda utilizar la clorpromacina (CPZ) como control positivo, pues es la sustancia que se ha empleado en el estudio de validación EU/COLIPA. Se han definido los criterios de aceptación siguientes para el uso de CPZ conforme al protocolo normalizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+UVA), $EC_{50} = 0,1$ a $2,0 \mu\text{g/ml}$; CPZ no irradiada (-UVA), $EC_{50} = 7,0$ a $90,0 \mu\text{g/ml}$. El factor de fotoirritación (PIF), es decir, la variación de la EC_{50} ha de ser, al menos, de 6.

En lugar de la CPZ, pueden emplearse para los controles positivos en paralelo otras sustancias fototóxicas conocidas adecuadas a la naturaleza química o a las características de solubilidad de la sustancia de ensayo. En ese caso y sobre la base de los datos de referencia, deben definirse debidamente como criterios de aceptación para el ensayo los intervalos de los valores de la EC_{50} y el PIF o el MPE.

1.7. Descripción del método

1.7.1. Preparación

1.7.1.1. Células

Se recomienda el uso de una línea celular permanente de fibroblastos de ratón —Balb/c 3T3, clon 31—procedente del ATCC o ECACC, pues es la que se ha empleado en el estudio de validación. También pueden obtenerse buenos resultados utilizando otras células o líneas celulares según el mismo protocolo de ensayo, siempre y cuando las condiciones de cultivo estén adaptadas a las necesidades particulares de las células, si bien en tal caso debe demostrarse la equivalencia.

Debe comprobarse periódicamente que las células no están contaminadas por micoplasmas y sólo se utilizarán si los resultados de las comprobaciones son satisfactorios.

Dado que la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA puede aumentar con el número de pasos, deben emplearse células Balb/c 3T3 sometidas al menor número posible de pasos, preferiblemente menos de 100. Es importante comprobar periódicamente la sensibilidad de las células Balb/c 3T3 a las radiaciones UVA conforme al procedimiento de control de calidad descrito en las presentes directrices.

1.7.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Deben emplearse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados para los pasos celulares sistemáticos y durante el procedimiento de ensayo. En el caso de las células Balb/c 3T3, el medio de cultivo es DMEM enriquecido con un 10 % de suero de ternera recién nacida, 4 mM de glutamina, penicilina y estreptomycin, y han de incubarse en atmósfera humidificada, a $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$. Es particularmente importante que las condiciones de cultivo celular permitan mantener la duración del ciclo celular dentro de los límites normales de la línea celular o las células utilizadas.

1.7.1.3. Preparación de los cultivos

Se siembran células procedentes de cultivos *stock* congelados en un medio de cultivo a una densidad apropiada y se subcultivan al menos una vez antes de utilizarlas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

Para el ensayo de fototoxicidad, las células se siembran en el medio a una densidad que impida que los cultivos confluyan antes de que finalice el ensayo, es decir, cuando se determine la viabilidad celular 48 horas después de la siembra celular. Para las células Balb/c 3T3 cultivadas en placas de 96 pocillos, se recomienda una densidad de 1×10^4 células por pocillo.

Para cada sustancia de ensayo se siembran las células de igual modo en dos placas distintas de 96 pocillos, que se mantendrán en condiciones de cultivo idénticas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo, excepto durante el tiempo en que una de ellas se irradia (+UVA/luz visible) y la otra se mantiene en la oscuridad (-UVA/luz visible).

1.7.1.4. Activación metabólica

Si bien es necesario utilizar sistemas de activación metabólica para todos los ensayos *in vitro* de predicción del potencial genotóxico o carcinogénico, en el caso de la fototoxicología no se conoce hasta la fecha ninguna sustancia química que requiera una transformación metabólica para actuar como fototoxina *in vivo* o *in vitro*. Por consiguiente, no resulta necesario ni está fundado científicamente realizar el presente ensayo con un sistema de activación metabólica.

1.7.1.5. Sustancia de ensayo-Preparación

Las sustancias de ensayo deben prepararse justo antes de emplearlas, salvo que los datos de estabilidad demuestren que pueden conservarse. Puede ser necesario prepararlas bajo luz roja si es probable que se produzca una fotodegradación rápida.

Las sustancias de ensayo se disuelven en soluciones tampón salinas, como la solución salina equilibrada de Earl (EBSS) o la solución tampón fosfato (*Phosphate Buffered Saline-PBS*), que no deben contener componentes proteicos ni colorantes indicadores de pH que absorban la luz, con el fin de evitar interferencias durante la irradiación.

Las sustancias de ensayo poco solubles en agua han de disolverse en disolventes apropiados a 100 veces la concentración final deseada y a continuación diluirse a 1:100 con la solución tampón salina. Si se emplea un disolvente, debe hacerse a un volumen constante del 1 % (v/v) y en todos los cultivos, es decir, en los controles negativos y en todas las concentraciones de la sustancia de ensayo.

Se recomienda el uso de los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (EtOH). Pueden emplearse otros disolventes de baja citotoxicidad (por ejemplo acetona), pero deben evaluarse detenidamente sus propiedades particulares (capacidad de reaccionar con la sustancia de ensayo, de atenuar el efecto fototóxico, de captar radicales).

Si es preciso, puede emplearse un agitador mecánico, la sonicación o el calentamiento a 37°C para facilitar la disolución.

1.7.1.6. Irradiación UV-Preparación

Fuente de luz: la elección de una fuente de luz y un filtrado apropiados es el factor determinante de los ensayos de fototoxicidad. Las porciones de radiación UVA y de luz visible suelen asociarse a la fotosensibilización (7) (10), mientras que las de UVB revisten menor importancia, son directamente muy citotóxicas y su citotoxicidad se multiplica por 1000 entre 313 y 280 nm (11). Uno de los principales criterios para elegir una fuente de luz adecuada es que ésta emita longitudes de onda absorbidas por la sustancia de ensayo y que la dosis de luz (que pueda obtenerse en un tiempo razonable) sea suficiente para detectar los fotosensibilizadores conocidos. Además de ello, las longitudes de onda y las dosis empleadas no han de ser innecesariamente nocivas para el sistema de ensayo, teniendo en cuenta la emisión de calor (porción de infrarrojos).

La mejor fuente de luz es la de los simuladores de radiación solar, en los que se emplean tanto arcos de xenón como arcos de mercurio (dopado) con haluro de metal. Estos últimos presentan la ventaja de emitir menos calor y de ser más económicos, pero no reproducen exactamente la luz solar. Dado que todos los simuladores de radiación solar emiten cantidades importantes de rayos UVB, deben emplearse los filtros adecuados para atenuar sus longitudes de onda altamente citotóxicas.

Para el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU debe usarse un espectro de irradiancia prácticamente exento de UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Se ha publicado un ejemplo de la distribución de la irradiancia espectral del simulador de la radiación solar filtrada utilizado en el estudio de validación del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (3).

Dosimetría: debe comprobarse con regularidad la intensidad de luz (irradiancia) antes de cada ensayo de fototoxicidad con un medidor de UV de banda ancha adecuado y previamente calibrado en función de la fuente de luz. Ha de comprobarse, asimismo, el correcto funcionamiento de dicho aparato, para lo cual se recomienda utilizar otro medidor de UV de referencia del mismo tipo y calibrado de igual manera. Lo ideal sería emplear, a intervalos mayores, un espectrorradiómetro para medir la irradiancia espectral de la fuente de luz filtrada y comprobar el calibrado del medidor de UV de banda ancha, si bien es cierto que para manejar esos instrumentos se precisa personal debidamente cualificado.

En el estudio de validación se determinó que la dosis de 5 J/cm² (UVA) no resulta citotóxica para las células Balb/c 3T3 y que es suficientemente potente para activar incluso las sustancias químicas débilmente fototóxicas. Para obtener 5 J/cm² en un plazo de 50 minutos, la irradiancia ha de ajustarse a 1,666 mW/cm². Si se emplea otra línea celular u otra fuente de luz, puede ser preciso adaptar ligeramente la dosis de rayos UVA de manera que no dañe las células y sea suficiente para detectar fototoxinas de referencia. La duración de la exposición a la luz se calcula de la manera siguiente:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dosis de irradiación (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiancia (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W segundo})$$

1.7.2. Condiciones de ensayo

La concentración máxima de la sustancia de ensayo no debe superar los 100 µg/ml, pues todas las sustancias fototóxicas han sido detectadas con concentraciones inferiores y, además, con concentraciones superiores aumenta la incidencia de falsos positivos (sobrepredicción) (13). El pH de la concentración más alta de sustancia de ensayo ha de ser satisfactorio (pH entre 6,5 y 7,8).

Los rangos de las concentraciones de la sustancia de ensayo en presencia (+UVA) y en ausencia (-UVA) de luz deben determinarse de forma adecuada mediante experimentos previos (*range-finder experiments*). El rango y el intervalo de una serie de concentraciones debe ajustarse de manera que las curvas de concentración-respuesta estén suficientemente confirmadas por los datos experimentales. Debe utilizarse una progresión geométrica de concentraciones (con un factor de dilución constante).

1.7.3. Procedimiento ⁽¹⁾

1.7.3.1. Primer día

Se prepara una suspensión de 1×10^5 células/ml en el medio de cultivo y se vierten 100 µl de medio de cultivo sólo en los pocillos periféricos de una microplaca de cultivo tisular de 96 pocillos (= ensayos en blanco). En los demás pocillos se vierten 100 µl de una suspensión de 1×10^5 células/ml (= 1×10^4 células/pocillo). Se preparan dos placas con cada sustancia de ensayo: una para determinar la citotoxicidad (-UVA) y la otra para determinar la fotocitotoxicidad (+UVA).

Se incuban las células durante 24 horas (7,5 % CO₂, 37°C) hasta que formen una monocapa semiconfluyente. Este período de incubación permite la recuperación, la adherencia y el crecimiento exponencial de las células.

1.7.3.2. Segundo día

Tras la incubación, se decanta el medio de cultivo de las células y se efectúan dos lavados con 150 µl de EBSS/PBS por pocillo. Se añaden 100 µl de EBSS/PBS que contengan la concentración adecuada de la sustancia de ensayo o sólo disolvente (control negativo). Se añaden 8 concentraciones distintas de la sustancia de ensayo. Se incuban las células con la sustancia de ensayo durante 60 minutos en la oscuridad (7,5 % CO₂, 37°C).

Para realizar la parte (+UVA) del ensayo se irradian las células a temperatura ambiente durante 50 minutos a través de la tapa de la placa de 96 pocillos con una dosis de 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Se airea con un ventilador para evitar la condensación de H₂O bajo la tapa. Se mantienen las placas que no se van a irradiar (-UVA) a temperatura ambiente durante 50 minutos (= tiempo de exposición a los rayos UVA) en la oscuridad.

Se decanta la solución de ensayo y se lava dos veces con 150 µl de EBSS/PBS. Se sustituye la EBSS/PBS por el medio de cultivo y se incuba (7,5 % CO₂, 37°C) hasta el día siguiente (18-22 horas).

1.7.3.3. Tercer día

Evaluación microscópica

Se examinan las células en un microscopio con dispositivo para contraste de fase. Se registran los cambios morfológicos de las células debidos a los efectos citotóxicos de la sustancia de ensayo. Se recomienda efectuar esta comprobación para excluir los errores experimentales, si bien las observaciones no se emplean para evaluar la citotoxicidad ni la fototoxicidad.

Ensayo de captación del rojo neutro

Se lavan las células con 150 µl de EBSS/PBS precalentada. Se elimina la solución de lavado con unos golpecitos suaves. Se añaden 100 µl de medio con NR y se incuba durante 3 horas a 37°C, en atmósfera humidificada con 7,5 % CO₂.

Tras la incubación, se elimina el medio con NR y se lavan las células con 150 µl de EBSS/PBS. Se decanta y se absorbe completamente la EBSS/PBS (Facultativo: centrifugado de la placa invertida).

Se añaden exactamente 150 µl de solución de desorción del NR (solución de etanol/ácido acético recién preparada).

Se agita rápidamente la placa en un agitador de microplacas durante 10 minutos, hasta que el NR se extraiga de las células y forme una solución homogénea.

Se mide la densidad óptica del extracto de NR a 540 nm en un espectrofotómetro y se utilizan los ensayos en blanco como referencia. Se guardan los datos en un formato de fichero apropiado (por ejemplo ASCII) para su posterior análisis.

⁽¹⁾ La referencia 12 de la bibliografía contiene mayor información.

2. RESULTADOS

2.1. Calidad y cantidad de los resultados

Los datos deben permitir un análisis significativo de las respuestas obtenidas con cada concentración, en presencia y en ausencia de radiación UVA/luz visible. Si se comprueba que hay fototoxicidad, tanto el rango de concentraciones como el intervalo entre cada concentración deben establecerse de manera que los datos experimentales puedan representarse en una curva. Dado que una sustancia de ensayo puede no producir efectos citotóxicos con la concentración límite definida de 100 µg/ml en el experimento realizado en la oscuridad (-UVA), pero puede resultar muy citotóxica en el experimento irradiado (+UVA), puede ser necesario emplear rangos de concentraciones de órdenes de magnitud distintos en las dos partes del experimento para obtener resultados de calidad adecuada. Si no se comprueba citotoxicidad en ninguna de las dos partes del experimento (-UVA y +UVA), es suficiente realizar el ensayo con concentraciones separadas por un gran intervalo hasta alcanzar la concentración máxima.

No es preciso comprobar un resultado claramente positivo repitiendo el experimento. Los resultados claramente negativos tampoco han de comprobarse, siempre y cuando la sustancia se haya sometido a ensayo a concentraciones suficientemente altas. En esos casos, basta realizar un experimento principal y uno o varios experimentos previos para determinar los rangos de concentraciones.

Los ensayos que den resultados límite, próximos a la línea de corte del modelo de predicción, deben comprobarse repitiendo el experimento.

Si se considera necesario repetir el ensayo, puede ser importante modificar las condiciones experimentales para obtener un resultado inequívoco. En este ensayo, la preparación de las soluciones de la sustancia problema constituye una variable fundamental. Por consiguiente, al repetir el ensayo puede ser esencial modificar dichas condiciones (codisolvente, trituración, sonicación, etc.). También puede plantearse modificar la duración de la incubación previa a la irradiación. En el caso de las sustancias inestables en el agua puede ser conveniente reducir dicha duración.

2.2. Tratamiento de los resultados

Si es posible, conviene determinar la concentración de sustancia de ensayo que da lugar a una inhibición del 50 % de la captación celular de rojo neutro (EC₅₀). Puede hacerse aplicando cualquier método de regresión no lineal adecuado (preferiblemente una función de Hill o una regresión logística) a los resultados de respuesta a las concentraciones o mediante otros métodos de ajuste (14). Antes de emplear una EC₅₀ para los cálculos posteriores, ha de comprobarse debidamente la calidad del ajuste. También pueden utilizarse métodos de ajuste gráfico para calcular la EC₅₀. En tal caso, se recomienda usar papel probabilístico (eje x: log, eje y: probit), pues en numerosas ocasiones la función concentración-respuesta pasa a ser prácticamente lineal después de esa transformación.

2.3. Evaluación de los resultados (modelos de predicción)

2.3.1. Modelo de predicción-versión 1: factor de fotoirritación (PIF)

Si, tanto en presencia (+UVA) como en ausencia (-UVA) de luz, se obtienen curvas completas de concentración-respuesta, se calcula el factor de fotoirritación (PIF) mediante la fórmula siguiente:

$$a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un PIF < 5 predice la ausencia de potencial fototóxico, mientras que un PIF ≥ 5 predice la existencia de potencial fototóxico.

Si una sustancia es citotóxica en presencia de luz (+UVA) y no lo es en ausencia de luz (-UVA), no puede calcularse el PIF, si bien ese resultado indica la existencia de potencial fototóxico. En tales casos, puede calcularse un "> PIF" si el ensayo de citotoxicidad (-UV) se ha realizado hasta la concentración de ensayo máxima (C_{max}), pues éste es el valor que se emplea para el cálculo del "> PIF":

$$b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Si únicamente puede obtenerse un "> PIF", todo valor > 1 predice un potencial fototóxico.

Si no puede calcularse ni la EC₅₀ (-UV) ni la EC₅₀ (+UV) porque la sustancia no produce efectos citotóxicos ni a la concentración de ensayo máxima, significa que ésta carece de potencial fototóxico. En tal caso, se utiliza un "PIF = * 1" teórico para caracterizar el resultado.

$$c) \quad PIF = * 1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Si únicamente puede obtenerse un "PIF = * 1", el ensayo predice la ausencia de potencial fototóxico.

En los casos b) y c), a la hora de predecir el potencial fototóxico deben tomarse detenidamente en consideración las concentraciones alcanzadas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

2.3.2. Modelo de predicción-versión 2: fotoefecto medio (MPE)

Puede aplicarse como variante una nueva versión del modelo de predicción del potencial fototóxico, que se ha elaborado sobre la base de los datos del estudio de validación EU/COLIPA (15) y se ha probado en ciego en un estudio posterior relativo a la fototoxicidad *in vitro* de sustancias empleadas como de UV (13). Este modelo permite superar la limitación del modelo basado en el PIF en los casos en que no puede obtenerse una EC₅₀. El modelo utiliza el fotoefecto medio (MPE), que es una medida basada en la comparación de las curvas completas de concentración-respuesta. Para aplicar el modelo MPE, la Universidad Humboldt (Berlín, Alemania) ha elaborado un programa informático especial, que puede obtenerse de forma gratuita.

2.4. Interpretación de los resultados

Un resultado positivo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 o MPE $\geq 0,1$) indica que la sustancia de ensayo presenta un potencial fototóxico. Si dicho resultado se ha producido con concentraciones inferiores a 10 µg/ml, es probable que la sustancia de ensayo también tenga efectos fototóxicos en diversas condiciones de exposición *in vivo*. Si el resultado es positivo únicamente con la concentración de ensayo máxima de 100 µg/mL, para evaluar el peligro o el poder fototóxico puede ser necesario tomar en consideración otros aspectos como la penetración y la absorción cutáneas y la posible acumulación de la sustancia en la piel, o someter la sustancia a otro tipo de ensayo para confirmar los resultados empleando, por ejemplo, un modelo de piel humana *in vitro*.

Un resultado negativo en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 o MPE < 0,1) indica que la sustancia de ensayo no tiene efectos fototóxicos en las células cultivadas de mamífero en las condiciones aplicadas. Si la sustancia se ha podido someter a ensayo hasta la concentración máxima de 100 µg/ml, un resultado negativo indica que la sustancia carece de potencial fototóxico y es improbable que produzca efectos fototóxicos *in vivo*. Si se obtienen reacciones tóxicas idénticas (EC₅₀ + UV y EC₅₀ - UV) con concentraciones inferiores, los datos han de interpretarse del mismo modo. Sin embargo, si no se ha producido toxicidad (+ UV y - UV) y la solubilidad de la sustancia de ensayo en el agua ha limitado las concentraciones a menos de 100 µg/ml, cabe dudar de la compatibilidad de la sustancia con el método de ensayo y debe plantearse la realización de un ensayo de confirmación (por ejemplo, con un modelo de piel *in vitro* o *ex vivo*, o bien un ensayo *in vivo*).

3. INFORME

Informe del ensayo

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- datos de identificación y nº CAS, si se conoce,
- naturaleza física y pureza,
- propiedades fisicoquímicas importantes para la realización del estudio,
- estabilidad y fotoestabilidad, si se conocen.

Disolvente:

- justificación de la elección del disolvente,
- solubilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente,
- porcentaje de disolvente presente en el medio de tratamiento (EBSS o PBS).

Células:

- tipo y procedencia de las células,
- ausencia de micoplasma,
- número de pasos celulares, si se conoce,
- sensibilidad de las células a la radiación UVA, determinada con el equipo de irradiación utilizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

Condiciones de ensayo (a)-Incubación antes y después del tratamiento:

- tipo y composición del medio de cultivo,
- condiciones de incubación (concentración de CO₂, temperatura y humedad),
- duración de la incubación (tratamiento previo y posterior).

Condiciones de ensayo (b)-Tratamiento con la sustancia:

- fundamento de la elección de concentraciones de la sustancia de ensayo empleadas en presencia y en ausencia de radiación UV/luz visible,
- en caso de que la sustancia de ensayo sea escasamente soluble y no sea citotóxica, fundamento de la elección de la mayor concentración empleada,
- tipo y composición del medio de tratamiento (solución salina tampón),
- duración del tratamiento químico.

Condiciones de ensayo (c)-Irradiación:

- fundamento de la elección de la fuente de luz empleada,
- características de la irradiancia espectral de la fuente de luz,
- características de transmisión/absorción del filtro o filtros utilizados,
- características del radiómetro y condiciones de calibrado,
- distancia entre la fuente de luz y el sistema de ensayo,
- irradiancia UVA a esa distancia, expresada en mW/cm^2 ,
- duración de la exposición a la radiación UV/luz visible,
- dosis de radiación UVA (irradiancia $\times$ tiempo), expresada en J/cm^2 ,
- temperatura aplicada a los cultivos celulares durante la irradiación y a los mantenidos en la oscuridad en paralelo.

Condiciones de ensayo (d)-Ensayo NRU:

- composición del medio NR,
- duración de la incubación en NR,
- condiciones de incubación (concentración de CO_2 , temperatura y humedad),
- condiciones de extracción del NR (agente de extracción, duración),
- longitud de onda empleada para la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica del NR,
- segunda longitud de onda (referencia), si procede,
- contenido del ensayo en blanco del espectrofotómetro, si procede.

Resultados:

- viabilidad celular obtenida con cada concentración de la sustancia de ensayo, expresada en % de la viabilidad media de los controles,
- curvas de concentración-respuesta (concentración de la sustancia de ensayo — viabilidad celular relativa), obtenidas en los experimentos +UVA y -UVA realizados en paralelo,
- análisis de los datos derivados de las curvas de concentración-respuesta: si es posible, computación/cálculo de la EC_{50} (+UVA) y EC_{50} (-UVA),
- comparación de las dos curvas de concentración-respuesta obtenidas en presencia y en ausencia de irradiación UVA/luz visible, calculando el factor de fotoirritación (PIF) o el fotoefecto medio (MPE),
- clasificación del potencial fototóxico,
- criterios de aceptación del ensayo (a)-Control negativo en paralelo:
 - viabilidad absoluta (densidad óptica del extracto de NR) de las células irradiadas y las no irradiadas,
 - datos de referencia del control negativo, media y desviación estándar,
- criterios de aceptación del ensayo (b)-Control positivo en paralelo:
 - EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) y PIF de la sustancia del control positivo,
 - datos de referencia de la sustancia del control positivo: EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) y PIF, media y desviación estándar.

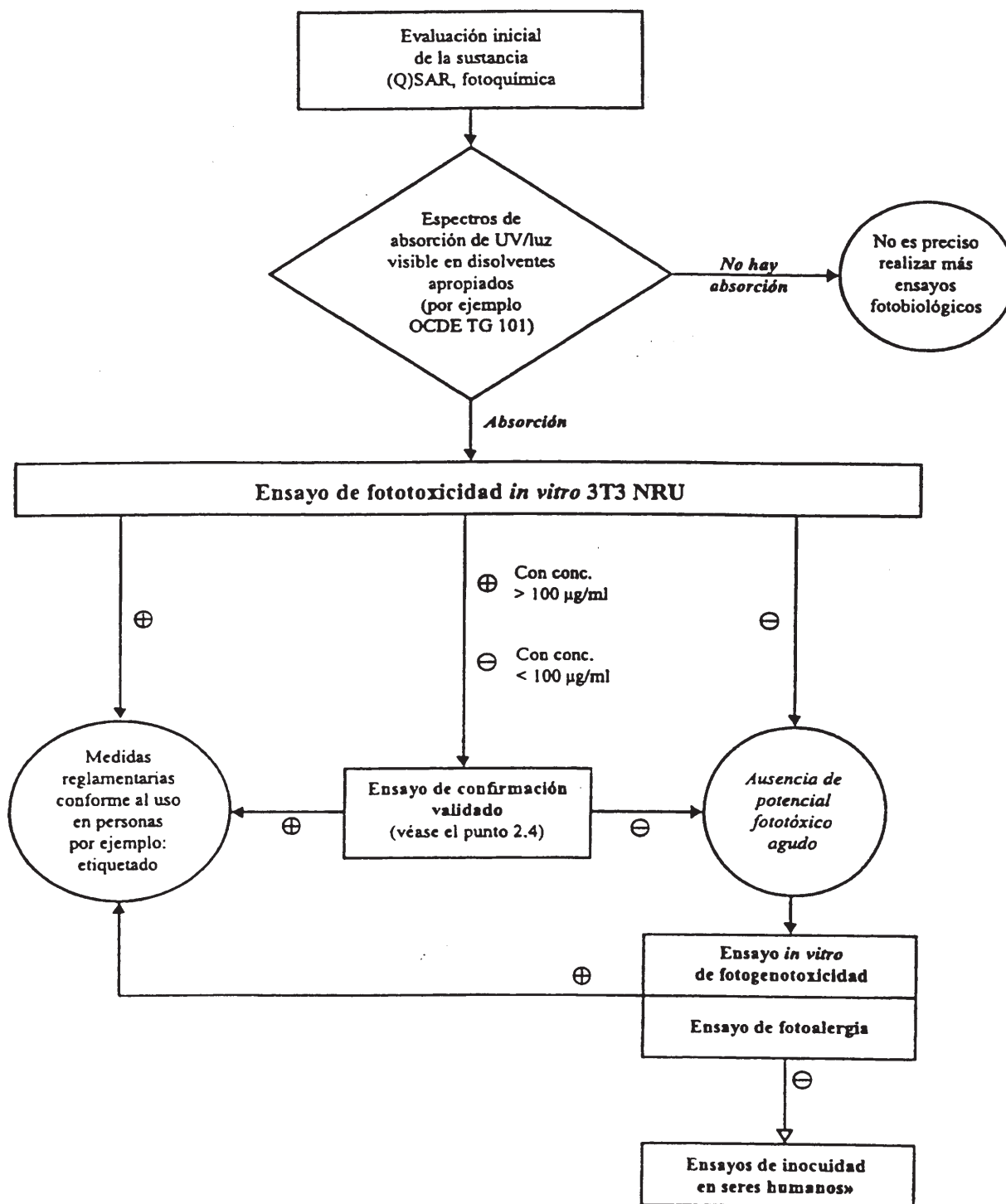
*Discusión de los resultados.**Conclusiones.*

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, pp. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, pp. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pp. 119-124.
- (10) Lambert L. A., Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pp. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phototoxicity Test, ATLA 26, pp. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pp. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals, ATLA 25, pp. 445-462.

Apéndice

Función del ensayo de fototoxicidad 3T3 NRU en un enfoque secuencial de los ensayos de fototoxicidad de sustancias químicas



ANEXO - C

PARTE A

Disposiciones relativas a los cierres de seguridad para niños

Además de lo dispuesto en el apartado 1 de artículo 18 del presente Reglamento, los envases que, independientemente de su capacidad, contengan sustancias que represente un peligro por aspiración (Xn; R65) y estén clasificadas y etiquetadas de acuerdo con el punto 3.2.3. del anexo VI del presente Reglamento con excepción de las sustancias comercializadas en forma de aerosol o en un envase provisto de sistema de pulverización sellado, deberán ir provistos de un cierre de seguridad para niños.

1. Envases que pueden volver a cerrarse

Los cierres de seguridad para niños que se empleen en envases que pueden volver a cerrarse deberán ajustarse a la norma ISO 8317 (edición de 1 de julio de 1989) sobre "Envases de seguridad a prueba de niños - Requisitos y método de ensayo para envases que pueden volver a cerrarse", adoptada por la Organización Internacional de Normalización (ISO).

2. Envases que no pueden volver a cerrarse

Los cierres de seguridad para niños que se empleen en envases que no pueden volver a cerrarse deberán ajustarse a la norma CEN 862 (edición de marzo de 1997) sobre "Envases de seguridad a prueba de niños - Requisitos y métodos de ensayo para envases que no pueden volver a cerrarse para productos no farmacéuticos", adoptada por el Comité Europeo de Normalización (CEN).

3. Observaciones

1. Sólo podrán certificar la conformidad con las mencionadas normas aquellos laboratorios que hayan demostrado que cumplen las normas europeas EN de la serie 45.000.

2. Casos particulares

Cuando parezca evidente que un envase es suficientemente seguro para los niños, en particular porque éstos no pueden acceder a su contenido sin ayuda de un instrumento, podrá omitirse el ensayo.

En todos los demás casos, y cuando existan motivos válidamente justificados para dudar de la eficacia del cierre de seguridad utilizado a prueba de niños, la autoridad nacional podrá solicitar al responsable de la comercialización un certificado, emitido por un laboratorio de ensayo del tipo definido en el punto 3.1, que certifique:

- Que el tipo de cierre utilizado es tal que no es preciso efectuar ensayos conforme a las normas ISO o CEN anteriormente mencionadas.

o

- Que el cierre de que se trata, una vez sometido a los ensayos establecidos por las normas mencionadas, es conforme a las prescripciones establecidas.

PARTE B

Disposiciones relativas a los dispositivos que permiten detectar los peligros al tacto

Las especificaciones técnicas de los dispositivos que permiten detectar los peligros al tacto deberán ajustarse a la norma ISOEN 11683 (edición de 1997) sobre "Envases, Marcas Táctiles de Peligro. Requisitos".

ANEXO – D

1.6. Los datos necesarios para la clasificación y el etiquetado de sustancias podrán obtenerse:

- a) con respecto a las sustancias para las que sea imprescindible la información especificada en el anexo VII, la mayor parte de los datos necesarios para su clasificación y etiquetado figurarán en el "expediente de base". Ambos, clasificación y etiquetado, se revisarán, si fuera necesario, cuando se disponga de información complementaria (anexo VIII);
- b) con respecto a las demás sustancias (por ejemplo, las del punto 1.5), los datos necesarios para su clasificación y etiquetado podrán obtenerse de diversas fuentes, tales como resultados de ensayos anteriores, indicaciones exigidas por la normativa internacional en materia de transporte de mercancías peligrosas, información recogida en trabajos de referencia y en bibliografía o información generada por la experiencia práctica. También se podrán tomar en consideración, cuando proceda, los resultados de relaciones validadas estructura-actividad y la opinión de expertos.

Los datos necesarios para la clasificación y el etiquetado de preparados podrán obtenerse:

- a) en cuanto a los datos fisicoquímicos, aplicando los métodos del anexo V. Para los preparados gaseosos se puede utilizar un método de cálculo de las propiedades inflamables y comburentes (véase el capítulo 9);
- b) en cuanto a los datos relativos a los efectos sobre la salud:
 - aplicando los métodos del anexo V o el método convencional que se indica en los números 1 al 9 del apartado 5 del artículo 3 del Reglamento de Preparados o, en el caso de R65, aplicando las normas del punto 3.2.3,
 - sin embargo, para la evaluación de propiedades carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción, se aplicará el método convencional preceptuado en los números 10 al 17 del apartado 5 del artículo 3 del Reglamento de Preparados.

Nota referente a los resultados de los ensayos con animales

La realización de ensayos con animales para obtener datos experimentales está sujeta a lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo.

1.7.2. Aplicación de los criterios de guía a las sustancias

Los criterios establecidos en el presente anexo serán directamente aplicables cuando los datos se hayan obtenido utilizando métodos de ensayo equivalentes a los descritos en el anexo V. En otros casos, los datos disponibles deberán evaluarse comparando los métodos de ensayo de que se trate con los métodos contemplados en el anexo V y con las normas previstas en el presente anexo, a fin de determinar la clasificación y el etiquetado más adecuados.

En algunos casos puede haber dudas sobre la aplicación o no de los criterios pertinentes, especialmente si se precisan conocimientos especializados. En tales casos, el fabricante, distribuidor o importador clasificarán y etiquetarán provisionalmente la sustancia basándose en una evaluación de los datos realizada por una persona competente.

Sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 6, se se ha aplicado el procedimiento anterior y se temen posibles incoherencias, se podrá proponer la inclusión de la clasificación provisional en el anexo I. Dicha propuesta se presentará a uno de los Estados miembros e irá acompañada de los datos científicos apropiados (véase también el punto 4.1).

Se podrá aplicar un procedimiento similar en caso de que se disponga de información que haga dudar de la exactitud de una entrada existente en el anexo I.

2.2.2.1. Observaciones sobre los peróxidos

En lo que se refiere a las propiedades explosivas, todo peróxido orgánico o preparado que lo contenga en la forma en que es comercializado se clasificará de acuerdo con los criterios del punto 2.2.1 sobre la base de los ensayos realizados con arreglo a los métodos indicados en el anexo V.

Respecto a las propiedades comburentes, los actuales métodos del anexo V no pueden aplicarse a los peróxidos orgánicos.

En cuanto a las sustancias, los peróxidos orgánicos que no hayan sido clasificados ya como explosivos se clasificarán como peligrosos en función de su estructura (por ejemplo: R-O-O-H; R₁-O-O-R₂).

Los preparados que no hayan sido clasificados ya como explosivos se clasificarán aplicando el método de cálculo basado en el porcentaje de oxígeno activo que se recoge en el punto 9.5

Todo peróxido orgánico, o preparado que lo contenga, que no haya sido clasificado ya como explosivo se clasificará como comburente si el peróxido o su formulación contiene:

- más de 5 % de peróxidos orgánicos, o
- más del 0,5 % de oxígeno disponible procedente de los peróxidos orgánicos, y más del 5 % de peróxido de hidrógeno.

3.2.3. Nocivo

Las sustancias y preparados se clasificarán como nocivos, asignándoseles el símbolo "Xn" y la indicación de peligro "Nocivo", según los criterios que se especifican a continuación. Se asignarán las frases de riesgo en función de los criterios siguientes:

R 22 Nocivo por ingestión

Toxicidad aguda:

- DL₅₀ por vía oral, en rata: $200 < LD_{50} \leq 2\,000$ mg/kg,
- dosis discriminante, vía oral, en rata, 50 mg/kg: 100 % de supervivencia, con toxicidad evidente,
- menos del 100 % de supervivencia con 500 mg/kg, vía oral, en rata, por el procedimiento de la dosis fija. Véase el cuadro de evaluación del método B1 bis del anexo V.

R 21 Nocivo en contacto con la piel

Toxicidad aguda:

- DL₅₀ por penetración cutánea, en rata o en conejo: $400 < LD_{50} \leq 2\,000$ mg/kg.

R 20 Nocivo por inhalación

Toxicidad aguda:

- CL₅₀ por inhalación, en rata, para aerosoles o partículas: $1 < CL_{50} \leq 5$ mg/l/4 h,
- CL₅₀ por inhalación, en rata, para gases o vapores: $2 < CL_{50} \leq 20$ mg/l/4 h.

R 65 Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar

Sustancias y preparados líquidos que presentan riesgo de aspiración para las personas debido a su baja viscosidad:

- a) sustancias y preparados que contienen hidrocarburos alifáticos, alicíclicos o aromáticos en una concentración total, igual o superior al 10 %, y que tienen:
 - un período de flujo inferior a 30 s en un recipiente ISO de 3 mm con arreglo a ISO 2431, o
 - una viscosidad cinemática medida con un viscosímetro capilar de cristal calibrado con arreglo a ISO 3104/3105 inferior a 7×10^{-6} m²/s a 40 °C, o
 - una viscosidad cinemática derivada de las mediciones de la viscosimetría rotativa con arreglo a ISO 3129 inferior a 7×10^{-6} m²/s a 40 °C.

Nótese que las sustancias y preparados que cumplen estos criterios no tienen por qué ser clasificados si su tensión superficial media es superior a 33 mN/m a 25 °C medida mediante el tensiómetro de Nouy o los métodos de ensayo del punto 5 de la parte A del anexo V;

- b) en el caso de las demás sustancias y preparados, no sujetos a los criterios anteriores, según la experiencia práctica con personas.

R 40 Posible riesgo de efectos irreversibles

- Datos convincentes de que, aparte de los efectos mencionados en el capítulo 4, pueden provocarse daños irreversibles como consecuencia de una única exposición por una vía susceptible, generalmente en el intervalo de valores arriba citado.

Para indicar la vía de administración/exposición se asignará una de las combinaciones siguientes: R 40/20, R 40/21, R 40/22, R 40/20/21, R 40/20/22, R 40/21/22, R 40/20/21/22.

R 48 Peligro de grave daño para la salud por exposición prolongada

- Se puede producir un daño grave (claro trastorno funcional o cambio morfológico de significación toxicológica) como consecuencia de una exposición repetida o prolongada por una vía susceptible.

Las sustancias y preparados se clasificarán al menos como nocivos si se observan estos efectos con dosis del orden de:

- vía oral, en rata: ≤ 50 mg/kg (peso corporal)/día,
- vía cutáneo, en rata o conejo: ≤ 100 mg/kg (peso corporal)/día,
- inhalación, en rata: $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/día.

Pueden aplicarse directamente estos valores indicativos cuando se hayan observado lesiones graves en un ensayo de toxicidad subcrónica (noventa días). Al interpretarse los resultados de un ensayo de toxicidad subaguda (veintiocho días), estas cifras deberán multiplicarse por tres aproximadamente. Si existe un ensayo de toxicidad crónica (dos años), la evaluación deberá realizarse caso por caso. Si se dispone de resultados de estudios de más de una duración, se utilizarán normalmente los obtenidos en el estudio más largo.

Para indicar la vía de administración/exposición se asignará una de las combinaciones siguientes: R 48/20, R 48/21, R 48/22, R 48/20/21, R 48/20/22, R 48/21/22, R 48/20/21/22.

3.2.3.1. Comentarios concernientes a las sustancias volátiles

En el caso de ciertas sustancias con una elevada concentración de vapor saturado, pueden existir datos que indiquen efectos preocupantes. Tales sustancias pueden no estar clasificadas según los criterios de efectos para la salud recogidos en esta guía (3.2.3) o no estar cubiertos por el punto 3.2.8. Sin embargo, si existen indicios suficientes de que pueden representar un riesgo cuando se utilicen y manipulen en condiciones normales, puede ser necesario clasificarlas una por una en el anexo I.

3.2.6.1. Inflamación cutánea

Se asignará la siguiente frase de riesgo según los criterios indicados:

R 38 Irrita la piel

- Sustancias y preparados que producen una inflamación cutánea importante, que persiste al menos 24 horas tras un período de exposición de hasta 4 horas, establecida en conejos, según el método de ensayo de irritación cutánea que figura en el anexo V.

La inflamación cutánea se considerará importante si:

- a) el valor medio de las puntuaciones de la formación de eritemas y escaras, o de edema, valor calculado teniendo en cuenta todos los animales del ensayo, es igual o superior a 2;
- b) o bien, en caso de que el ensayo del anexo V se hubiera realizado en tres animales, cuando se haya observado en dos o más animales una formación de eritemas y escaras o de edemas equivalente a un valor medio igual o superior a 2 calculado por cada animal individualmente.

En ambos casos, al calcular las medias respectivas, deberán utilizarse todos los resultados de cada uno de los períodos de lectura (24, 48 y 72 horas) para cada efecto.

La inflamación cutánea también se considerará importante si persiste en un mínimo de dos animales, al final del período de observación. También deberán tenerse en cuenta efectos especiales como, por ejemplo, hiperplasia, descamación, decoloración, formación de fisuras o costras y alopecia.

Los datos pertinentes pueden también obtenerse de estudios no agudos en animales (véanse los comentarios sobre la frase R 48, punto 2.d). Éstos se considerarán significativos si los efectos observados son comparables a los arriba descritos.

- Sustancias y preparados que producen una inflamación cutánea importante por contacto inmediato, prolongado o repetido, comprobada en observaciones prácticas en seres humanos.
- Peróxidos orgánicos, excepto si se demuestra lo contrario.

Parestesia: La parestesia causada en seres humanos por contacto de plaguicidas piretroides con la piel no se considera un efecto irritante que justifique la clasificación como Xi; R 38. No obstante, debe aplicarse la frase S 24 a las sustancias que produzcan este efecto.

3.2.8. Otras propiedades toxicológicas

Se asignarán otras frases de riesgo de acuerdo con los criterios siguientes (basados en la experiencia obtenida durante la elaboración del anexo I) a las sustancias y preparados clasificados en virtud de los puntos 2.2.1 a 3.2.7 anteriores y los capítulos 4 y 5.

R 29 Libera gas tóxico en contacto con el agua

Sustancias y preparados que, en contacto con el agua o con aire húmedo, desprenden gases tóxicos o muy tóxicos en cantidades potencialmente peligrosas (por ejemplo, fosfuro de aluminio o pentasulfuro de fósforo).

R 31 Libera gas tóxico en contacto con ácidos

Sustancias y preparados que reaccionan con ácidos desprendiendo gases tóxicos en cantidades peligrosas (por ejemplo, hipoclorito de sodio o polisulfuro de bario). En cuanto a las sustancias de uso público, sería más adecuado utilizar la frase S 50 [No mezclar con ... (a especificar por el fabricante)].

R 32 Libera gas muy tóxico en contacto con ácidos

Sustancias y preparados que reaccionan con ácidos desprendiendo gases muy tóxicos en cantidades peligrosas (por ejemplo, sales de cianuro de hidrógeno o aziduro de sodio). En cuanto a las sustancias de uso público, es más adecuado utilizar la frase S 50 [No mezclar con ... (a especificar por el fabricante)].

R 33 Peligro de efectos acumulativos

Sustancias y preparados que pueden acumularse en el cuerpo humano, lo cual, aun siendo motivo de preocupación, no justifica el uso de la frase R 28.

R 64 Puede resultar nocivo para el lactante

Sustancias y preparados absorbidos por la mujer que pueden interferir con la lactancia, o estar presentes (incluidos los metabolitos) en la leche materna en cantidades suficientes para ser motivo de preocupación con respecto a la salud del lactante.

Para las observaciones sobre la utilización de esta frase R 64 (y, en algunos casos, la frase R 33), véase el punto 4.2.3.3.

R 66 La exposición repetida puede provocar sequedad o agrietamiento de la piel

Sustancias y preparados que pueden producir sequedad, descamación o agrietamiento de la piel, pero no cumplen los criterios de la frase R 38:

sobre la base de:

- la observación práctica tras manipulación y uso normal
- o bien, datos de sus efectos previstos sobre la piel.

Véanse asimismo los puntos 1.6 y 1.7.

R 67 La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y mareo

Sustancias y preparados volátiles que contengan sustancias que puedan causar síntomas claros de depresión del sistema nervioso central por inhalación y que no estén clasificados ya en función de su toxicidad aguda por inhalación (R 20, R 23, R 26, R 40/20, R 39/23 o R 39/26).

Se podrán aportar los datos siguientes:

- a) datos de estudios sobre animales que muestren claros signos de depresión del SNC como, por ejemplo, efectos narcóticos, letargia, falta de coordinación (incluida la pérdida del reflejo de enderezamiento) y ataxia,
ya sea:
 - a concentraciones/tiempos de exposición no superiores a 20 mg/l/4 h, o
 - con un cociente $< 1/10$ entre la concentración del efecto a < 4 h y la concentración de vapor saturado (SVC) a 20°C;
- b) experiencias prácticas con seres humanos (por ejemplo: narcosis, somnolencia, aturdimiento, pérdida de reflejos, falta de coordinación, vértigo) incluidas en informes bien documentados en condiciones de exposición comparables a las que producen los efectos especificados anteriormente en animales.

Véanse también los puntos 1.6 y 1.7.

Para otras frases de riesgo, véase el punto 2.2.6.

- 4.1.2. Si un fabricante, distribuidor o importador dispone de información que aconseje clasificar y etiquetar una sustancia conforme a los criterios enunciados en los puntos 4.2.1, 4.2.2 o 4.2.3, etiquetará provisionalmente dicha sustancia con arreglo a tales criterios, a partir de una evaluación de las pruebas realizada por una persona competente.
- 4.1.3. El fabricante, distribuidor o importador presentará lo antes posible al Estado miembro donde se comercialice la sustancia un documento que resuma toda la información pertinente. Dicho resumen contendrá una bibliografía exhaustiva, incluidos cualesquiera datos pertinentes no publicados.
- 4.1.4. Además, si el fabricante, distribuidor o importador dispone de nuevos datos pertinentes para la clasificación o etiquetado de una sustancia con arreglo a los criterios enunciados en los puntos 4.2.1, 4.2.2 o 4.2.3, los presentará lo antes posible al Estado miembro donde se comercialice la sustancia.

5.2.2. Medio ambiente no acuático

- 5.2.2.1. Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente y se les asignará el símbolo "N", y la correspondiente indicación de peligro y frase de riesgo, en función de los criterios siguientes:

R 54: Tóxico para la flora

R 55: Tóxico para la fauna

R 56: Tóxico para los organismos del suelo

R 57: Tóxico para las abejas

R 58: Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente

Sustancias que, según los datos de que se dispone sobre sus propiedades, persistencia, potencial de acumulación y su destino y comportamiento en el medio ambiente —previsibles u observados— puedan suponer un peligro inmediato, retardado o a largo plazo para la estructura o funcionamiento de otros ecosistemas naturales aparte de los referidos en el punto 5.2.1. Se elaborarán criterios más detallados en el futuro.

- 5.2.2.2. Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente y se les asignará el símbolo "N", y la correspondiente indicación de peligro y frase de riesgo, en función de los criterios siguientes:

R 59: Peligroso para la capa de ozono

Sustancias que pueden representar, de acuerdo con los datos disponibles sobre sus propiedades, así como sobre su destino medioambiental y su comportamiento previsibles u observados, un peligro para la estructura y/o el funcionamiento de la capa estratosférica de ozono. Esto incluye las sustancias enumeradas en el anexo I del Reglamento (CE) n° 3093/94 del Consejo, de 15 de diciembre de 1994, relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono (DO L 333 de 22.12.1994, p. 1) y en sus modificaciones posteriores.

6.2. Frases de prudencia para sustancias y preparados**S 1 Consérvese bajo llave**

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados arriba citados de venta al público.

S 2 Manténgase fuera del alcance de los niños

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para todas las sustancias y preparados peligrosos de venta al público, a excepción de los clasificados sólo como peligrosos para el medio ambiente.

S 3 Consérvese en lugar fresco

- Aplicación:
 - peróxidos orgánicos,
 - otras sustancias o preparados peligrosos con punto de ebullición $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para los peróxidos orgánicos, salvo si se utiliza la frase S 47,
 - recomendada para otras sustancias o preparados peligrosos con punto de ebullición $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

S 4 Manténgase lejos de locales habitados

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a las sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos, cuando convenga complementar la frase S 13; por ejemplo, cuando haya riesgo de inhalación y dichas sustancias o preparados deban almacenarse fuera de locales habitados. La advertencia no pretende impedir la correcta utilización de tales sustancias o preparados en locales habitados.

S 5 Consérvese en ... (líquido apropiado a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados sólidos espontáneamente inflamables.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, el sodio, el potasio o el fósforo blanco.

S 6 Consérvese en ... (gas inerte a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados peligrosos que deban conservarse en atmósfera inerte.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, determinados compuestos organometálicos.

S 7 Manténgase el recipiente bien cerrado

- Aplicación:
 - peróxidos orgánicos,
 - sustancias y preparados que puedan desprender gases muy tóxicos, tóxicos, nocivos o extremadamente inflamables,
 - sustancias y preparados que, en contacto con la humedad, desprendan gases extremadamente inflamables,
 - sólidos fácilmente inflamables.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para los peróxidos orgánicos,
 - recomendada para los demás casos arriba citados.

S 8 Manténgase el recipiente en lugar seco

- Aplicación:
 - Sustancias y preparados que puedan reaccionar violentamente con el agua,
 - sustancias y preparados que, en contacto con el agua, liberen gases extremadamente inflamables,
 - sustancias y preparados que, en contacto con el agua, liberen gases muy tóxicos o tóxicos.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a los casos arriba citados, cuando sea necesario reforzar las advertencias de las frases R 14, R 15 en particular, y R 29.

S 9 Mantenga el recipiente en lugar bien ventilado

- Aplicación:
 - sustancias y preparados volátiles que puedan desprender vapores muy tóxicos, tóxicos o nocivos,
 - líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables y gases extremadamente inflamables.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados volátiles que puedan desprender vapores muy tóxicos, tóxicos o nocivos,
 - recomendada para líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables o gases extremadamente inflamables.

S 12 No cerrar el recipiente herméticamente

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que puedan hacer estallar el recipiente que los contiene por desprendimiento de gases o vapores.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a los casos especiales arriba citados.

S 13 Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y nocivos.
- Criterios de utilización:
 - recomendada cuando dichas sustancias o preparados sean de uso público.

S 14 Manténgase lejos de ... (materiales incompatibles a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - peróxidos orgánicos.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para los peróxidos orgánicos y limitada, normalmente, a los mismos. No obstante, puede ser útil en ciertos casos excepcionales, cuando la incompatibilidad pueda provocar un riesgo determinado.

S 15 Conservar alejado del calor

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que puedan descomponerse o reaccionar espontáneamente por efecto del calor.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo los monómeros, salvo si ya se les han asignado las frases R 2, R 3 y/o R 5.

S 16 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar

- Aplicación:
 - líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables y gases extremadamente inflamables.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados arriba mencionados, salvo si ya se les han asignado las frases R 2, R 3 y/o R 5.

S 17 Manténgase lejos de materiales combustibles

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que puedan formar mezclas explosivas o espontáneamente inflamables con materiales combustibles.
- Criterios de utilización:
 - en casos especiales (por ejemplo, para reforzar las frases R 8 y R 9).

S 18 Manipúlese y ábrase el recipiente con prudencia

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que puedan producir una sobrepresión en el recipiente,
 - sustancias y preparados que puedan ocasionar la formación de peróxidos explosivos.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a los casos arriba citados cuando haya riesgo de lesiones oculares o cuando dichas sustancias y preparados sean de uso público.

S 20 No comer ni beber durante su utilización

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales (por ejemplo, arsénico y compuestos de arsénico, fluoracetatos), en particular cuando tales sustancias y preparados sean de uso público.

S 21 No fume durante su utilización

- Aplicación:
 - sustancias y preparados cuya combustión produzca compuestos tóxicos.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo compuestos halogenados.

S 22 No respirar el polvo

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados sólidos peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados antes citados a los que se asigne la frase R 42,
 - recomendada para las sustancias y preparados arriba mencionados que se suministran en forma de polvo inhalable y cuyos riesgos para la salud por inhalación se desconocen.

S 23 No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles (denominaciones adecuadas a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados líquidos o gaseosos peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados antes citados a los que se asigne la frase R 42,
 - obligatoria para las sustancias y preparados que se vayan a utilizar en forma de aerosoles. Se deberá asignar además la frase S 38 o la S 51,
 - recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por inhalación no indicados en las frases de riesgo asignadas.

S 24 Evítese el contacto con la piel

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados a los que se haya asignado la frase R 43, salvo que también se haya asignado la S 36,
 - recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por contacto con la piel no mencionados en las frases de riesgo (por ejemplo, parestesia), asignadas a dichas sustancias. No obstante, esta frase podrá utilizarse también para reforzar tales frases de riesgo.

S 25 Evítese el contacto con los ojos

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización:
 - recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por contacto con los ojos no mencionados en las frases de riesgo obligatorias. No obstante, esta frase podrá utilizarse también para reforzar tales frases de riesgo,
 - recomendada para las sustancias que tengan asignadas las frases R 34, R 35, R 36 o R 41 y que sean de uso público.

S 26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico

— Aplicación:

- sustancias y preparados corrosivos o irritantes.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para las sustancias y preparados, así como para las sustancias y preparados que deban llevar la frase R 41,
- recomendada para las sustancias y preparados irritantes que deban llevar la frase R 36.

S 27 Quítese inmediatamente la ropa contaminada

— Aplicación:

- sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o corrosivos.

— Criterios de utilización:

- obligatoria en las sustancias y preparados muy tóxicos a los que se ha asignado la frase R 27 y que sean de uso público,
- recomendada en el caso de sustancias y preparados muy tóxicos utilizados en la industria a los que se ha asignado la frase R 27. Sin embargo, esta frase de prudencia no se deberá utilizar cuando se haya asignado la frase S 36,
- recomendada para las sustancias y preparados tóxicos a los que se ha asignado la frase R 24, así como para las sustancias y preparados corrosivos de uso público.

S 28 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con ... (a especificar por el fabricante).

— Aplicación:

- sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o corrosivos.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para las sustancias y preparados muy tóxicos,
- recomendada para las otras sustancias y preparados antes citados, especialmente cuando el agua no sea el líquido más apropiado para el lavado,
- recomendada para las sustancias y preparados corrosivos de uso público.

S 29 No tirar los residuos por el desagüe

— Aplicación:

- líquidos extremadamente o fácilmente inflamables que sean inmiscibles con el agua,
- sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos,
- sustancias peligrosas para el medio ambiente.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para las sustancias peligrosas para el medio ambiente a las que se haya asignado el símbolo "N" y que sean de uso público, a menos que estén destinadas para ello,
- recomendada para las demás sustancias y preparados arriba citados que sean de uso público, a menos que estén destinados para ello.

S 30 No echar jamás agua a este producto

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que reaccionen violentamente con el agua.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo ácido sulfúrico. También podrá utilizarse para aclarar una información, para reforzar la frase R 14 o, incluso, como alternativa a la frase R 14.

S 33 Evítese la acumulación de cargas electroestáticas

- Aplicación:
 - sustancias y preparados extremada o fácilmente inflamables.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados utilizados en la industria que no absorban la humedad. No se usará prácticamente nunca para las sustancias y preparados de venta al público.

S 35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados cuya eliminación adecuada exija instrucciones especiales.

S 36 Usen indumentaria protectora adecuada

- Aplicación:
 - peróxidos orgánicos,
 - sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o nocivos,
 - sustancias y preparados corrosivos.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para sustancias y preparados muy tóxicos y corrosivos,
 - obligatoria para sustancias y preparados a los que se haya asignado la frase R 21 o R 24,
 - obligatoria para las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción de la categoría 3, salvo cuando los efectos se produzcan sólo por inhalación de la sustancia o el preparado,
 - obligatoria para los peróxidos orgánicos,
 - recomendada para las sustancias y preparados tóxicos si no se conoce el valor DL_{50} por vía cutánea y es probable que la sustancia o preparado resulten tóxicos en contacto con la piel,
 - recomendada para las sustancias y preparados utilizados en la industria cuando puedan causar daño a la salud tras una exposición prolongada.

S 37 Usen guantes adecuados

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos, nocivos o corrosivos,
 - peróxidos orgánicos,
 - sustancias y preparados irritantes para la piel o sensibilizantes por contacto con la piel.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para sustancias y preparados muy tóxicos y corrosivos,
- obligatoria para sustancias y preparados a los que se haya asignado la frase R 21, R 24 o R 43,
- obligatoria para las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción de la categoría 3, salvo cuando los efectos se produzcan sólo por inhalación de la sustancia o preparado,
- obligatoria para los peróxidos orgánicos,
- recomendada para las sustancias y preparados tóxicos si no se conoce el valor DL_{50} por vía cutánea y es probable que la sustancia o preparado resulten nocivos en contacto con la piel,
- recomendada para las sustancias y preparados irritantes para la piel.

S 38 En caso de ventilación insuficiente, usen un equipo respiratorio adecuado

— Aplicación:

- sustancias y preparados muy tóxicos o tóxicos.

— Criterios de utilización:

- limitada normalmente a los casos especiales en que se utilizan sustancias y preparados muy tóxicos o tóxicos en la industria o en la agricultura.

S 39 Usen protección para los ojos/la cara

— Aplicación:

- peróxidos orgánicos,
- sustancias y preparados corrosivos, incluidos los irritantes, que puedan provocar lesiones oculares graves,
- sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para las sustancias y preparados a los que se haya asignado la frase R 34, R 35 o R 41,
- obligatoria para los peróxidos orgánicos,
- recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por contacto con los ojos no mencionados en las frases de riesgo obligatorias,
- limitada normalmente a casos excepcionales en que haya riesgo de salpicaduras al utilizar sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos, y éstos sean fácilmente absorbibles por la piel.

S 40 Para limpiar el suelo y los objetos contaminados por este producto, úsese ... (a especificar por el fabricante)

— Aplicación:

- todas las sustancias y preparados peligrosos.

— Criterios de utilización:

- limitada normalmente a las sustancias y preparados peligrosos para los que el agua no es el agente de limpieza más idóneo (por ejemplo, cuando deban absorberse con un material pulverulento o disolverse con un disolvente) y en caso de que sea importante, por razones de salud o seguridad, mostrar esta advertencia en la etiqueta.

S 41 En caso de incendio y/o de explosión no respirar los humos

— Aplicación:

- sustancias y preparados peligrosos en cuya combustión se desprendan gases muy tóxicos o tóxicos.

— Criterios de utilización:

- limitada normalmente a casos especiales

S 42 Durante las fumigaciones/pulverizaciones use un equipo respiratorio adecuado (denominaciones adecuadas a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados destinados a tal uso, pero que puedan poner en peligro la salud y la seguridad del usuario si no se toman las medidas de precaución adecuadas.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales.

S 43 En caso de incendio, utilizar ... (en el espacio en blanco el fabricante deberá indicar el tipo preciso de equipo contraincendios). (Si el agua aumenta el riesgo, se deberá añadir: "No usar nunca agua")

- Aplicación:
 - sustancias y preparados extremadamente inflamables, fácilmente inflamables e inflamables.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprendan gases extremadamente inflamables,
 - recomendada para las sustancias y preparados extremadamente inflamables, fácilmente inflamables e inflamables, especialmente cuando no sean miscibles con el agua.

S 45 En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (si es posible, muéstrole la etiqueta)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos,
 - sustancias y preparados tóxicos y corrosivos,
 - sustancias y preparados sensibilizantes por inhalación.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados mencionados anteriormente.

S 46 En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrole la etiqueta o el envase

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos excepto los muy tóxicos, tóxicos, corrosivos o peligrosos para el medio ambiente.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para todas sustancias y preparados peligrosos arriba citados de uso público, salvo si su ingestión puede considerarse inofensiva, especialmente para los niños.

S 47 Consérvese a una temperatura no superior a ... °C (a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que se vuelvan inestables a cierta temperatura.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales (por ejemplo, determinados peróxidos orgánicos).

S 48 Consérvese húmedo con ... (material apropiado, a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que, si se desecan, pueden ser muy sensibles a las chispas, al frotamiento o al choque.
- Criterios de utilización:
 - limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo las nitrocelulosas.

S 49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen

- Aplicación:
 - sustancias y preparados sensibles a la descomposición catalítica.
- Criterios de utilización:
 - sustancias y preparados sensibles a la descomposición catalítica, por ejemplo algunos peróxidos orgánicos.

S 50 No mezclar con ... (a especificar por el fabricante)

- Aplicación:
 - sustancias y preparados que puedan reaccionar con el producto especificado y desprender gases muy tóxicos o tóxicos,
 - peróxidos orgánicos.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados antes citados de uso público, cuando esta frase sea preferible a la R 31 o R 32,
 - obligatoria para determinados peróxidos que puedan producir reacciones violentas con catalizadores o iniciadores.

S 51 Úsese únicamente en lugares bien ventilados

- Aplicación:
 - sustancias y preparados destinados a producir vapores, polvo, aerosoles, humos, nieblas, etc., o que puedan desprenderlos, que supongan riesgo por inhalación o peligro de incendio o explosión.
- Criterios de utilización:
 - recomendada cuando no convenga utilizar la frase S 38. Por consiguiente, el empleo de esta frase es importante cuando tales sustancias y preparados sean de uso público.

S 52 No usar sobre grandes superficies en locales habitados

- Aplicación:
 - sustancias volátiles muy tóxicas, tóxicas y nocivas y preparados que las contengan.
- Criterios de utilización:
 - recomendada cuando la exposición prolongada a dichas sustancias puede afectar a la salud a causa de su volatilización en grandes superficies situadas en el interior de viviendas o locales cerrados donde se congregan personas.

S 53 Evítese la exposición — Recábense instrucciones especiales antes del uso

- Aplicación:
 - sustancias y preparados carcinogénicos, mutagénicos y/o tóxicos para la reproducción.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados antes mencionados a los que se han asignado las frases R 45, R 46, R 47, R 49, R 60 o R 61.

S 56 Elimínense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para todas las sustancias y preparados de uso público y que precisen una eliminación especial.

S 57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente

- Aplicación:
 - sustancias y preparados a las que se haya asignado el símbolo "N".
- Criterios de utilización:
 - limitada en general a las sustancias que no son de uso público.

S 59 Remitirse al fabricante o proveedor para obtener información sobre su recuperación/reciclado

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias peligrosas para la capa de ozono,
 - recomendada para otras sustancias y preparados cuya recuperación o reciclado se recomiende.

S 60 Elimínese el producto y su recipiente como residuos peligrosos

- Aplicación:
 - todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización:
 - recomendada para las sustancias y preparados que no sean de uso público cuando no se haya asignado la frase S 35.

S 61 Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad

- Aplicación:
 - sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización:
 - utilizada normalmente en sustancias a las que se haya asignado el símbolo "N",
 - recomendada para todas las sustancias clasificadas como peligrosas para el medio ambiente que no estén incluidas en la descripción anterior.

S 62 En caso de ingestión no provoque el vómito: acuda inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase

- Aplicación:
 - sustancias y preparados clasificados como nocivos a los que se haya asignado la frase R 65 según los criterios del punto 3.2.3,
 - no aplicable a sustancias y preparados que se comercialicen en envases para aerosoles (o en envases con un dispositivo nebulizador sellado); véanse las secciones 8 y 9.
- Criterios de utilización:
 - obligatoria para las sustancias y preparados antes citados, de venta o uso público, excepto en los casos en que sean obligatorias las frases S 45 o S 46,
 - recomendada para las sustancias y preparados antes citados cuando se empleen en la industria, excepto en los casos en que sean obligatorias las frases S 45 o S 46.

S 63 En caso de accidente por inhalación, transporte a la persona afectada al aire libre y manténgala en reposo

- Aplicación:
 - sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos (gases, vapores, partículas, líquidos volátiles),
 - sustancias y preparados que produzcan sensibilización respiratoria.

— Criterios de utilización:

- obligatoria para las sustancias y preparados a los que se han asignado las frases R 26, R 23 o R 42 y que pueden ser utilizados por el público de manera que se produzca inhalación.

S 64 En caso de ingestión, enjuáguese la boca con agua (sólo si la persona está consciente)

— Aplicación:

- sustancias y preparados corrosivos o irritantes.

— Criterios de utilización:

- recomendada para las sustancias y preparados citados de uso público, en caso de que el tratamiento descrito sea el indicado.

7.5.2. Elección de las frases de prudencia

La elección final de las frases de prudencia deberá realizarse teniendo en cuenta las frases de riesgo indicadas en la etiqueta y el uso previsto de la sustancia o preparado:

- por regla general, bastará con un máximo de cuatro frases S para formular de modo adecuado los consejos de precaución; a tal efecto, las frases compuestas del anexo IV se considerarán simples;
- en el caso de las frases S sobre eliminación, se utilizará una de ellas, a menos que esté claro que la eliminación del material y de su envase no supone peligro para la salud humana o el medio ambiente. En particular, es importante aconsejar sobre la eliminación con todas las precauciones posibles en el caso de las sustancias y preparados de venta al público;
- si se seleccionan cuidadosamente las frases S, algunas frases R resultarán superfluas, y viceversa; algunas frases S que corresponden claramente a frases de riesgo sólo figurarán en la etiqueta cuando se quiera destacar una advertencia concreta;
- en la elección de frases S, se prestará atención muy especial a las condiciones de uso previstas para determinadas sustancias y preparados, por ejemplo la pulverización u otros efectos de los aerosoles. Se elegirán las frases teniendo en cuenta la utilización prevista;
- las frases de prudencia S 1, S 2 y S 45 son obligatorias para todas las sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos de venta al público;
- las frases de prudencia S 2 y S 46 son obligatorias para todas las demás sustancias (excepto las clasificadas sólo como peligrosas para el medio ambiente) y los preparados peligrosos de venta al público.

Se podrán eliminar algunas de las frases seleccionadas según los criterios estrictos del punto 6.2 cuando den lugar a redundancias o ambigüedades, o resulten claramente innecesarias para el producto o envase concretos.

8. CASOS ESPECIALES: Sustancias

8.1. Botellas portátiles de gas

Se considerará que las botellas de gas reúnen los requisitos en materia de etiquetado cuando cumplan lo dispuesto en el artículo 19 del Reglamento de sustancias o en el artículo 20.5. b del mismo.

Sin embargo, como excepción a lo dispuesto en los apartados 1 y 2 del artículo 20, podrá utilizarse una de las siguientes alternativas para las botellas de gas con una capacidad igual o inferior a 150 litros:

- el formato y las dimensiones de la etiqueta pueden ajustarse a las prescripciones de la norma ISO/DP 7225,
- la información especificada en el apartado 1 del artículo 19 puede aparecer sobre un disco o una etiqueta duradera de información que se mantendrá unida a la botella.

8.2. Bombonas de gas propano, butano o gas licuado de petróleo (GLP)

Estas sustancias se clasifican en el anexo I. A pesar de estar clasificadas de conformidad con el artículo 2, no suponen riesgo para la salud humana si son comercializadas en botellas rellenables cerradas o en cartuchos no rellenables a los que se aplica la norma EN 417 en cuanto gases combustibles que sólo se liberan para la combustión.

Dichas botellas o cartuchos deben estar etiquetados con el símbolo apropiado y las frases R y S sobre su inflamabilidad. No se exige en la etiqueta información sobre los efectos para la salud humana. Sin embargo, la información sobre dichos efectos que debería figurar en la etiqueta la enviará al usuario profesional la persona responsable de la comercialización de esa sustancia con arreglo al modelo previsto en el artículo 23 del R.de sustancias. Se transmitirá suficiente información al consumidor para que éste pueda tomar todas las precauciones necesarias para la salud y la seguridad, según se dispone en dicho artículo y anexo XI del Reglamento de sustancias.

8.3. Metales en forma maciza

Estas sustancias están clasificadas en el anexo I o bien se clasificarán con arreglo al artículo 5.5. No obstante, algunas de ellas, aunque clasificadas conforme al artículo 2, no suponen peligro para la salud humana en caso de inhalación, ingestión o contacto con la piel, ni tampoco para el medio ambiente acuático, en la forma en que se comercializan. Tales sustancias no precisan una etiqueta conforme al artículo 19. Sin embargo, el responsable de su comercialización comunicará al usuario toda la información que debería haber figurado en la etiqueta, según el modelo establecido en el artículo 23 del Reglamento de sustancias.

8.4. Sustancias clasificadas con la frase R 65

Las sustancias clasificadas como nocivas por riesgo de aspiración no tendrán que ser etiquetadas como nocivas con la frase R 65 cuando se comercialicen en envases para aerosoles o en envases con dispositivo nebulizador sellado.»
