

Toxicología experimental

PRINCIPIOS GENERALES PARA LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD

A partir de la Directiva 548, del año 1967, del Consejo de la Comunidad Europea sobre la clasificación y etiquetado de las sustancias químicas, se ha sucedido una serie de disposiciones legales que han sido incorporadas por los Estados Miembros de la Unión Europea; de esta forma existe en Europa una unidad de criterios en cuanto a la clasificación de las sustancias por su peligrosidad para los seres vivos y los ecosistemas, y sobre los ensayos o experiencias que hay que realizar para valorar la peligrosidad de cada sustancia antes de que pueda ser comercializada.

A tal fin, los efectos peligrosos sobre la salud se han subdividido (O. M. de la Presidencia, de 20 de febrero de 1995, trasposición de la Directiva 93/21/CEE) en:

1. Efectos letales agudos (tras una sola exposición).
2. Efectos irreversibles no letales, tras una exposición.
3. Efectos graves tras exposición repetida o prolongada.
4. Efectos corrosivos.
5. Efectos irritantes.
6. Efectos sensibilizantes.
7. Efectos carcinogénicos.
8. Efectos mutagénicos.
9. Efectos tóxicos para la reproducción y el desarrollo.
10. Efectos tóxicos sobre el medio ambiente.

Una vez que se clasifica a una sustancia, después de los apropiados estudios experimentales, debe etiquetarse convenientemente, incluyendo explicaciones sobre los riesgos específicos (frases y símbolos R) y con consejos de prudencia (frases y símbolos S), junto con los anagramas dispuestos en la Directiva 88/379/CEE.

En cuanto a los efectos tóxicos sobre el medio ambiente, cabe distinguir si el objeto del estudio son grupos o poblaciones aisladas (materia de la *Toxicología ambiental*) o si se pretende el estudio global de los efectos sobre los ecosistemas (materia de la *Ecotoxicología*).

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse, aparte de las previsiones teóricas, por dos vías: estudios retrospectivos de casos de intoxicación y ensayos experimentales con animales y plantas. Sólo en muy contadas ocasiones se efectúa experimentación con seres humanos, debido a las implicaciones éticas y legales que ello tiene; de estudios retrospectivos sobre intoxicaciones ocurridas en humanos se obtienen los datos de «toxicidad humana estimada».

Los estudios toxicológicos con plantas están promovidos no sólo en interés de los productos fitosanitarios y del conocimiento de la fitotoxicidad de productos de uso agrícola (y sus frecuentes contaminaciones), sino también por la necesidad de conocer el metabolismo, transformación y retención de las sustancias tóxicas por los vegetales de consumo animal o humano, que no pueden superar lo que se conoce como límite máximo de residuos (LMR). Algunas técnicas utilizan plantas inferiores para el análisis toxicológico, como la desarrollada por nosotros (Repetto y Sanz, 1977) para la detección de herbicidas en sangre de intoxicados, u otras muestras, mediante cultivos de algas en placa de agar, al estilo de los antibiogramas. Sobre placas de agar sembradas con microalgas se colocan pequeños discos de papel impregnados del material sospechoso; la presencia de paraquat se detecta por la aparición de halos de inhibición del crecimiento del cultivo. Por el contrario, otros compuestos como los herbicidas hormonales 2,4-D o el 2,4,5-T, o herbicidas carbámicos o triazínicos, estimulan el crecimiento, con lo cual se originan halos de gran densidad.

En algunos estudios de toxicidad se utilizan larvas de anfibios, como en el método de Reiss aplicado a la investigación de los efectos tóxicos de las micotoxinas; se ensaya la actividad de aflatoxina B₁, diacetoxicirpenol y esterigmatocistina, sobre renacuajos y sobre la inhibición del desarrollo de huevos y larvas de rana y de tritón.

Experimentación con animales

El empleo de animales de experimentación, ya efectuado por los primitivos farmacólogos y toxicólogos, fue sistematizado por Trevan (1927) para la determinación de la dosis letal por vía oral. Posteriormente, la presión de las asociaciones protectoras de los animales y una mayor sensibilización de la sociedad ha conducido a la reducción del número de animales utilizados, a un refinamiento de las técnicas de ensayo para producir menor sufrimiento y, al propio tiempo, obtener mayor información con

menos experimentos, así como a sustituir animales mediante la introducción de los que se denominan *métodos alternativos*. Estas orientaciones fueron denominadas por Russell y Burch (1959) como las *tres erres* (3 R) (*reducción, refinamiento y reemplazo*).

En los últimos años se han reconocido los *derechos de los animales* y se han establecido unas *normas éticas* para la experimentación animal (Repetto, 1989). Ante ellos, tanto el legislador como el experimentador se encuentran con el dilema de respetar la nueva filosofía sin que se produzca menoscabo del progreso de la investigación científica. Así, el toxicólogo tiene el deber moral de diseñar sus experimentos de forma que obtenga la mayor cantidad de información posible a partir del menor número de animales.

Una forma de perseguir esta finalidad es comenzar los estudios de toxicidad con *métodos alternativos*, y, cuando ya se han alcanzado suficientes conocimientos sobre el producto en cuestión, confirmarlos y ampliarlos mediante ensayos con animales, lo que ya supone una gran disminución en el número de éstos.

El planteamiento de un protocolo tradicional de toxicología experimental con animales presenta, *a priori*, cuatro cuestiones que se deben resolver:

- a) especie animal a utilizar.
- b) número total y de grupos de animales,
- c) vías de administración que se deben emplear.
- d) tiempo de duración del estudio.

Normalmente, las soluciones a estos problemas son de carácter exclusivo para cada estudio, según el tipo de sustancia y el uso a que se destina.

Veamos más detenidamente las anteriores cuestiones:

- a) En general se utilizan animales pequeños, por razones económicas, como ratón, hámster, rata, cobayo, conejo y perro. En casos más concretos: aves, peces, gatos y monos. Una clase muy especial son los animales transgénicos que se utilizan sólo para estudios muy particulares; estos individuos derivan de un huevo reciente-

mente fertilizado, extraído de una hembra, al que se inyectan unas secuencias de ADN (si las secuencias se colocan en un cromosoma sustituyendo a secuencias similares de ADN, se denomina inserción homologa, pero si se hace al azar, se denomina no homologa). El animal que nace de este huevo recibe el nombre de fundador, y sus descendientes, que portan el ADN exógeno, constituyen una línea de animales transgénicos. Estos animales son muy útiles para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de los genes, y de la interferencia que los tóxicos introduzcan, así como de la trascendencia cinética o metabólica de poseer algunas proteínas modificadas o carecer de ellas. En la experimentación *in vitro* se emplean también células transgénicas.

Generalmente, la mayor seguridad y fiabilidad de los datos se obtiene empleando siempre más de una especie animal; aunque los más utilizados son los roedores, se recomienda repetir los ensayos con otras especies no roedoras. Siempre se usará la mitad de individuos de cada sexo; en caso de utilizar animales de un solo sexo, al expresar los resultados del estudio deberá indicarse claramente esta circunstancia.

Los animales deben proceder siempre de un bioterio de garantía, que asegure el empleo de ejemplares sanos, de una cepa estabilizada, con alimentación apropiada y escrupulosa higiene. En casos especiales se precisan sólo individuos homocigóticos, o consanguíneos, procedentes del cruce entre hermanos en sucesivas generaciones. Otras veces se exige una esterilidad tal, que se induce el nacimiento de los animales mediante cesárea y son conservados y criados en lugares y con alimentación estéril (véase Tabla 11.1). En ciertas ocasiones, es preciso programar el embarazo de las hembras para obtener fetos de tiempo apropiado al estudio. Para ello se sigue el ciclo estral de las hembras, introduciéndoles en la vagina, diariamente, unas gotas de agua con una pipeta; inmediatamente se succiona el agua y se deposita en un portaobjetos para observar al microscopio las células extraídas. Cuando aparecen las células comineadas propias del estro, se apareja el animal y se comienza a contar el tiempo de embarazo.

Tabla 11.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO SEGÚN SU FLORA BACTERIANA

-
1. Animales *gnotobióticos*: de flora conocida. Se subdividen en:
 - 1.1. *Axénicos*: estériles, sin ningún germen, nacidos, criados y mantenidos en aislamiento. Se simbolizan como GF (*germen free*).
 - 1.2. *Gnotoxénicos*: proceden de los anteriores, a los que se ha inoculado algún germen concreto.
 2. Animales *agnotobióticos*: no se puede asegurar que tengan continuamente una flora conocida. Se subdividen en:
 - 2.1. *Heteroxénicos* y también:
 - SPF = «*Specific pathogen free*».
 - PF = «*Pathogen free*».
 - COBS = «*Caesarian obtained, barrier sustained*».
 Se obtienen por cesárea y son criados y mantenidos en condiciones ambientales sanitarias muy controladas para evitar contaminación.
 - 2.2. *Holoxénicos*: son los clásicos o convencionales criados y mantenidos en condiciones ordinarias (GLP mínimas).
 - 2.3. *Neoholoxénicos*: son animales originariamente axénicos o heteroxénicos, criados en otras condiciones.
 3. Animales convencionales, criados y mantenidos en condiciones tradicionales. No deben ser utilizados para investigación farmacológica ni toxicológica.
-

En líneas generales, las especies más convenientes para las administraciones por las vías oral y parenteral son la rata y el perro, raramente el ratón; para la aplicación tópica, el conejo, y para ensayos de sensibilización el cobayo. Cuando se adquieren animales o se trasladan de local deben mantenerse en cuarentena, antes de usarlos, periodos que van de una semana, para ratas, a un mes, para perros. Después de utilizar unos animales en una experimentación toxicológica no deben volver a emplearse en otra experiencia, al objeto de evitar resultados anómalos. En todo lo concerniente a la estabulación y manejo de los animales es obligado cumplir los códigos de Prácticas Correctoras de Laboratorio (en inglés

Good Laboratory Practice, GLP). (Véase más adelante).

b) Número de animales. En cualquier grupo de individuos habrá unos más sensibles y otros más resistentes al tóxico (Fig. 11.1). En general, la frecuencia de animales sensibles se distribuye de forma gaussiana en relación al logaritmo de la dosis. En la Figura 11.2, la curva C, correspondiente a una sustancia C, muestra una respuesta de la población más homogénea que las A y B; por tanto, para el estudio de la sustancia C podremos utilizar un número de animales más reducido que para las A y B. El cálculo previo de estos números se basa en conceptos estadísticos que traspasan los propósitos de este libro. Actualmente se tiende a disminuir en lo posible el número de animales, incrementando el tratamiento matemático, (véase más adelante).

c) La elección de la vía de administración experimental se hace de acuerdo con el tipo de producto y la posible vía por la que el hombre lo absorbe. Así, un medicamento oral, cutáneo o parenteral requerirá tal vía de experimentación; un contaminante atmosférico deberá ser estudiado por las vías inhalatoria y cutánea.

Es muy importante atender a la naturaleza del vehículo o medio de dilución empleado, y siempre es necesario el estudio de un grupo de *animales de control*, a los que se aplique el vehículo solo, en idénticas condiciones ambientales y alimentarias.

d) Los estudios de toxicidad pueden desarrollarse con una sola administración (*toxicidad aguda*) o con tratamientos durante periodos cortos (toxicidad subcrónica, denominación que, de acuerdo con las directrices de la OCDE (1995), debe sustituirse por la de *toxicidad por*



Figura 11.1.

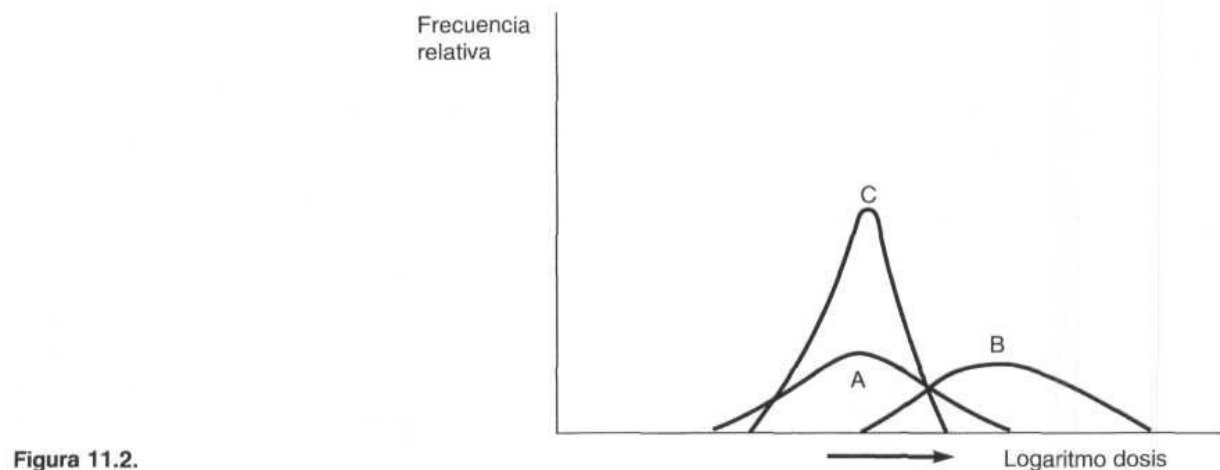


Figura 11.2.

dosis repetidas), medios o largos (*toxicidad crónica*). Jamás debe olvidarse la observación a largo plazo y la posible aparición de carcinogénesis y teratogénesis, la modificación de la fertilidad y todo lo que abarcan las expresiones *toxicidad para la reproducción y el desarrollo* (Tabla 11.2).

TOXICIDAD AGUDA

Recordemos que se entiende por toxicidad aguda la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras una sola dosis; estos efectos pueden variar desde mera irritación cutánea a la muerte. Por ser un parámetro muy evidente, se ha considerado tradicionalmente (Trevan, 1927) la dosis letal media (DL-50) como el mejor indicativo de la capacidad tóxica de una sustancia.

Sin embargo, el avance de los conocimientos toxicológicos y la mayor frecuencia actual de las intoxicaciones crónicas han disminuido el valor y significación de la DL-50. A pesar de que diversas legislaciones siguen calificando la peligrosidad de las sustancias sólo en función a su toxicidad aguda (DL-50), está claro que ésta no puede considerarse como una constante biológica del producto, sino que es un valor influible por numerosas variables, que lo reducen al carácter de un mero parámetro relativo de referencia.

En consecuencia, no se hace necesario esforzarse en obtener DL-50 con gran precisión, lo que simplifica el estudio y disminuye el número de animales sacrificados.

A esta consideración se unen dos estimaciones que reducen el margen de interés de la DL-50:

Tabla 11.2. ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN ANIMALES

I. Estudios de toxicidad aguda. Dosis única	
Objetivo	Determinación de DL-50 u otro efecto adverso.
Observación	Muertes a las 24 horas, 7, 15 y 30 días. Finalmente estudio histológico de todos los animales. Pruebas dérmicas sobre conejo.
Animales	Dos especies, una de no-roedores.
Vías de administración	Dos diferentes. Según posible incidencia en hombre.
II. Estudios de toxicidad crónica. Dosis diarias	
1. Medio plazo (subcrónica) o dosis repetidas	14, 28 o 90 días.
2. Largo plazo (crónica)	Mínimo 3 meses, 1-2 años.
Observaciones	Véanse tablas 11.2 y 11.3.
Animales	Especies seleccionadas en ensayos previos. Usualmente: 25 roedores y 6 perros por nivel de dosis.
Lotes	2-4 niveles, según DL-50, con 10 animales de cada sexo por nivel de dosis, como mínimo.
III. Estudios especiales	
a) Carcinogénesis.	
b) Teratogénesis.	
c) Fertilidad y viabilidad de descendencia.	
d) Lactación.	
e) Adicción.	
f) Comportamiento operante.	
g) Metabolismo.	
h) Metabolismo de órganos aislados.	

a) Una DL-50 inferior a 25 mg/kg es tan fuertemente tóxica, que no merece la pena de terminarla con mayor exactitud.

b) DL-50 superiores a 5.000 mg/kg representan tan baja toxicidad aguda, que tampoco deben ser investigadas (véase Tabla 11.3).

Como consecuencia de todo ello se ha admitido internacionalmente el concepto de *toxicidad aproximada* que clasifica las sustancias en cuatro categorías conforme a una DL-50 aproximada por vía oral.

- I. *Muy tóxica*: DL-50 inferior o igual a 25 mg/kg.
- II. *Tóxica*: DL-50 inferior o igual a 250 mg/kg.
- III. *Nociva*: DL-50 inferior o igual a 2.000 mg/kg.
- IV. *Sin toxicidad aguda* pero sin prejuzgar efectos crónicos, carcinogénesis, etc.): DL-50 igual o superior a 5.000 mg/kg.

Basadas en todo lo anterior y con aplicación bioestadística, se han propuesto metodías simplificadas para la determinación de la DL-50: por considerar que es más didáctica y presenta menor riesgo, nosotros expondremos la sistemática clásica.

Selección de la dosis. Una de las sistemáticas más simples es la siguiente:

Primeramente deberá hacerse un tanteo. Se elige una dosis inicial, de acuerdo con la toxi-

cidad teórica o prevista según la sustancia que está en estudio.

Esta dosis inicial se administra a un lote de 4 animales del mismo peso y sexo; si mueren todos (4/4), se divide la dosis por 4 y se aplica a otro lote de 4 animales; si en el primer ensayo no murió ningún animal (0/4), se multiplica la dosis por 4 y se administra a otro lote. Según la mortandad observada, se repiten los tanteos; de esta forma, utilizando el factor 4, o reduciéndolo progresivamente a 2 y 1,5, se podrá llegar a conocer qué dosis produce la muerte de todos los animales, y la llamaremos dosis letal máxima (DL_{máx}); también habremos visto la dosis más alta que sólo mata a un animal, y será estimada como dosis letal mínima DL_{mín}). El procedimiento *up and down* (Bruce, 1985) propone un factor de 1.3.

El *tiempo* que generalmente se espera para ver si se produce muerte por intoxicación aguda es de 24 horas, pero, como en ocasiones (p. ej., con el paraquat), el efecto puede aparecer mucho más tarde, debe mantenerse la observación de los animales 10 o 15 días. Es recomendable proseguir la observación durante un mes, y luego proceder al sacrificio, necropsia y estudio histológico de todos los animales utilizados.

Una vez conocidas la DL_{máx} y DL_{mín}, dividiremos el margen comprendido entre ambas en cinco fracciones progresivas, que se aplicarán a lotes de 10 animales. Llegará a obtenerse así la DL-50, con la que sólo muere el 50 por 100 del lote.

Tabla 11.3. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE TOXICIDAD (R.D. 2218/1985)

Categoría	VÍAS DE ABSORCIÓN		
	Oral	Cutánea	Inhalatoria
	Rata DL-50: mg/kg	Rata, conejo DL-50: mg/kg	Rata, 4 horas CL-50: mg/l
Muy tóxico	≤ 25	< 50	< 50
Tóxico	25-200	50-400	0,5-2
Nocivo	200-2.000	400-2.000	2-20
Riesgo subcrónico * Sensibilización	≤ 50/día	≤ 100/día	< 0,5/6 h/día

* Aparición de lesiones graves funcionales o morfológicas en tratamientos de 28-90 días. Igualmente para toxicidad crónica (2 años).

Tanto el método de Lorke (1983) como el de Schlegel (1989, 1994) consisten en utilizar grupos de 3 animales de un solo sexo a los que administran dosis muy diferentes del producto (separadas por factores de 10 o más); según los resultados de muertes o efectos claros en uno o varios animales de cada lote, se pasa a ensayar con otras dosis. Los resultados finales se someten a estudio probabilístico (*probits*) y se comprueban con un lote de animales del otro sexo y, por último, las sustancias se clasifican en *muy tóxicas*, *tóxicas*, *nocivas* y *sin clasificar*.

El método conocido de la *dosis fija* (Van de Heuvel (1990; Fielder, 1994), que ha sido admitido por la UE en 1990 y por la OCDE en 1992, se basa en la aplicación sucesiva de cuatro niveles de dosis a sendos lotes de 5 animales de un solo sexo (posteriormente se comprobaría con el otro sexo). Las dosis están comprendidas entre 5 mg/kg y 2.000 mg/kg, pero la mayor diferencia con los otros métodos es que los sucesivos pasos del estudio con otros lotes de animales no son decididos sólo por la proporción de muertes en los animales ensayados, sino también por los efectos tóxicos evidentes (Tabla 11.4).

En abril de 1996 la OCDE ha adoptado el *método por clase de toxicidad oral aguda*, en el que se utilizan 3 animales (rata) por etapa; según la mortalidad o la gravedad del estado de intoxicación de los animales, suelen requerirse dos a cuatro etapas, principalmente con dosis de 25, 200 y 2.000 mg/kg. con una secuencia parecida al método de dosis fija, y supone una notable reducción del número de animales empleados; su fiabilidad ha sido comprobada mediante un estudio internacional de validación patrocinado por Alemania y la OCDE.

En todo caso debe realizarse una observación previa de los animales, y una selección por pesos. Es necesario mantener a todos en ambiente idéntico (desde 5 días antes del ensayo) y efectuar la administración a la misma hora, para evitar influencias ambientales y los ritmos o ciclos circadianos.

El sistema más cómodo para *administrar* el producto en estudios es añadirlo a la comida o a la bebida, pero, debido a numerosos factores, esto no es posible a veces y, además, no resulta seguro el cálculo de la cantidad realmente absorbida y la desperdiciada. Por ello, en caso de que la vía de administración elegida sea la oral.

Tabla 11.4. MÉTODO DE DOSIS FIJA PARA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL APROXIMADA. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL, EN RATA, EN LOTES DE 5 ANIMALES

Dosis	Resultado	Interpretación
5 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Compuesto <i>muy tóxico</i> .
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente.	Compuesto <i>tóxico</i> .
50 mg/kg	Sin signos de toxicidad.	Ensayar dosis de 50 mg/kg.
	Supervivencia menor del 100 por 100.	Compuesto <i>muy tóxico</i> o <i>tóxico</i> .
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente.	Ensayar dosis de 5 mg/kg.
500 mg/kg	Sin signos de toxicidad.	Compuesto <i>nocivo</i> .
	Supervivencia menor del 100 por 100.	Ensayar dosis de 500 mg/kg.
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente.	Compuesto <i>tóxico</i> o <i>nocivo</i> .
	Sin signos de toxicidad.	Ensayar dosis de 50 mg/kg.
2.000 mg/kg	Supervivencia menor del 100 por 100.	Compuesto <i>nocivo</i> .
	Sin signos de toxicidad.	Ensayar dosis de 500 mg/kg.
	Supervivencia del 100 por 100 pero toxicidad evidente.	Compuesto sin riesgo de efectos agudos.
	Sin signos de toxicidad.	No precisa más ensayos.
		Ensayar dosis de 2.000 mg/kg.

se realiza mediante intubación gástrica, cuidando de que la sonda no penetre por la tráquea. El volumen administrado por ese procedimiento no debe superar 10 ml/kg de peso corporal del animal.

El uso de gran volumen de solución diluida puede producir mayores efectos tóxicos que la misma dosis a mayor concentración, si el mayor volumen obliga a un paso más rápido al intestino; por el contrario, las soluciones diluidas administradas por inyección producirán menores efectos de irritación local.

Las rutas parenterales más utilizadas son: inyección subcutánea (SC), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV). La administración subcutánea es fácil, y permite el empleo de soluciones o suspensiones grasas, inaplicables por vía venosa, pero las sustancias cáusticas o de pH no fisiológico producen mayor irritación; la absorción resulta más lenta. La vía intramuscular es más rápida; normalmente se aplica en los glúteos y músculos sacroespinales. La vía intraperitoneal consigue una absorción casi tan rápida como la intravenosa, y es útil cuando el número de aplicaciones es reducido, porque la agresión repetida en el lugar origina adherencias hísticas que pueden alterar los resultados.

En la administración parenteral los volúmenes deben limitarse a menos de 0,5 ml para roedores y 2 ml para animales mayores; cuando hay que aplicar cantidades superiores debe dividirse e inyectar las fracciones en diferentes lugares, aunque volúmenes acuosos excesivos pueden producir hiperhidratación y afectar la función renal. En general, el disolvente ideal es la solución salina isotónica, a pH comprendido entre 5 y 8. Recordemos que, en la rata, la inyección intravenosa de 1 ml de agua destilada por kilogramo de peso corporal produce bradicardia e hipertención.

Para determinar la DL-50 por vía dérmica (toxicidad percutánea) se aplica el producto sobre la piel del lomo del animal, previamente afeitada. Para estudiar la toxicidad por vía inhalatoria, donde la toxicidad aguda se expresa como CL-50, concentración letal media, se mantienen los animales en cámaras especiales en las que sólo el hocico esté expuesto al tóxico, y se evite la absorción percutánea.

TOXICIDAD CRÓNICA

La longevidad está en razón directa al peso corporal. Por ello, los 70 años de promedio de la vida humana se equiparan a los 2-4 años de la rata: por tanto, el plazo de administración para los estudios de cronicidad tendrá en cuenta esas proporciones. En general, y de acuerdo con la OMS, para los estudios de cronicidad se recomiendan plazos de 6-18 meses. A los 90 días debe sacrificarse una muestra de todos los grupos en estudio, para observación histológica.

La administración del producto debe realizarse todos los días, pues se ha observado que si se da 5 días a la semana, en lugar de los 7, el descanso de las 48 horas puede permitir la recuperación de los efectos tóxicos.

La selección de la dosis puede efectuarse en pruebas previas de 4 semanas. Como referencia suele emplearse la DL-50 y el tiempo promedio en que se produce la muerte con esa dosis. De acuerdo con estos parámetros, se calculan, al menos, cuatro niveles, de forma que el nivel de dosis más alta produzca algún efecto tóxico, específico o no.

Con la dosis inferior no deben aparecer efectos adversos; en el caso de medicamentos, aquélla debe ser como mínimo del orden de la dosis terapéutica o que produzca concentraciones sanguíneas semejantes a las que origina ésta en humanos. De esto se exceptúan los medicamentos, como los citostáticos, cuyo efecto propio es tóxico.

En cada uno de estos niveles deben usarse lotes de 20-30 roedores o de 4-8 no-roedores por nivel y sexo, con otro grupo control de igual número. Esto es importante para poder estimar las incidencias (enfermedades, muertes, etc.) de origen no tóxico.

Por acuerdo internacional, para evitar confusiones, se ha sustituido la expresión «toxicidad subaguda» por la de *toxicidad subcrónica* y últimamente (OCDE, 1995) por la de *toxicidad por dosis repetidas*, para aludir a ensayos con administraciones diarias, durante un periodo de tiempo inferior al 10 por 100 de la vida media del animal empleado; generalmente, las administraciones del producto se realizan durante 14, 28 o 90 días según los casos.

Tabla 11.5. OBSERVACIONES QUE SE DEBEN REALIZAR**Aspecto físico (diariamente):**

Posiciones extrañas.
 Posiciones de la cola, orejas, aletas.
 Piloerección.
 Salivación.
 Lagrimeo.
 Moqueo.
 Excretas.
 (véase Tabla 11.6).

Comportamiento:

Consumo de agua y alimentos.
 Actividad/inactividad espontáneas.
 Comportamiento exploratorio.
 Agresividad.
 Fonación, vocalización.
 Sedación.
 Estudios del condicionamiento operante.

Exámenes físicos:

Tono muscular.
 Temblores musculares.
 Convulsiones.
 Convulsiones tras estímulo.
 Parálisis.
 Catatonía.
 Alteración de reflejos: corneal, palpebral, de retirada, etc.
 Tamaño de pupila.
 Opacidad corneal.
 Sensibilidad al dolor.
 Lesiones en piel.
 Exámenes electrofisiológicos: polígrafo, ECG, EEG, etc.
 Muerte: posición de la cabeza, extremidades y cola.

Hematología (periódicamente y al final):

Hemograma.
 Recuento leucocitario y plaquetario.
 Hemoglobina.
 Hematócrito.
 Resistencia de los hematíes.

Quimismo sanguíneo (periódicamente y al final):

Glucemia.
 Proteínas.
 Coeficiente albúmina/globulinas.
 Colesterol, lípidos, triglicéridos.
 Transaminasas.
 Fosfatasa alcalina.
 Creatinfosfocinasa.
 Alantoína.
 Urea.
 Inmunoglobulinas.

Orina (periódicamente y al final):

Volumen.
 pH, color.
 Sedimentos.
 Glucosa.
 Albúmina.
 Cuerpos cetónicos.
 Pigmentos biliares.
 Sangre.
 Alantoína.

Autopsia de animales muertos o sacrificados:

Exámenes macroscópicos.
 Peso de los órganos.

Histopatología: óptica y electrónica.

Los estudios de toxicidad crónica a medio y a largo plazo no se diferencian, en el fondo, más que en su longitud. Los primeros deben durar, por lo menos, 3 meses y los segundos de 1 a 2 años, nunca menos de 6 meses. Durante este tiempo se prolongan las observaciones y análisis de los animales, conforme se expone en las Tablas 11.5 a 11.7.

Finalmente, se sacrifican todos los animales, se les realiza la autopsia y estudio anatomopatológico macroscópico; se pesan los órganos y se disponen para estudio microscópico. Debe ponerse especial atención a órganos como bazo, timo y nodulos linfáticos, que pueden revelar efectos inmunotóxicos. Actualmente revisten gran interés los estudios de sensibilización o alergia y los de inmunodepresión.

La *toxicología de la reproducción* incluye el estudio de los trastornos sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de los hijos:

a) Los *trastornos tóxicos de la fertilidad masculina o femenina* abarcan los efectos negativos sobre la libido, comportamiento sexual, afectación de la espermatogénesis o de la ovogénesis, de la actividad hormonal o las respuestas fisiológicas que puedan interferir la capacidad de fertilizar, o el proceso de fertilización o el de desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación, incluida esta última.

En los ensayos con animales, la administración del compuesto debe comenzar dos semanas antes del apareamiento.

b) *La toxicología del desarrollo* comprende

Tabla 11.6. EXÁMENES FÍSICOS EN PRUEBAS DE TOXICIDAD

Sistema	Observación	Signos de toxicidad
SN y motor	Comportamiento. Movimiento. Reactividad a estímulos. Reflejos cerebral y espinal. Tono muscular.	Actitud, vocalización, sedación. Crispadura, temblor, ataxia, catatonía, parálisis, movimientos forzados, convulsiones. Anestesia, pasividad, hiperestesia, irritabilidad. Pereza, ausencia. Rigidez, flaccidez.
Sistema nervioso autónomo	Tamaño de pupila. Secreciones. Nasal.	Miosis, midriasis. Salivación, lagrimación. Descarga.
Respiratorio	Carácter y respiración.	Disnea, bradipnea, Cheyne-Stokes, Kussmaul.
Cardiovascular	Palpación región cardíaca.	Bradycardia, arritmia, estremecimiento.
Gastrointestinal	Función. Aspecto abdominal. Heces.	Diarrea, estreñimiento. Flatulencia, contracción. No formadas, coloración.
Piel	Color, turgor, integridad.	Enrojecimiento, erupción, piloerección, flaccidez.
Mucosa	Conjuntiva, boca.	Congestión, hemorragia, cianosis, amarilla.
Ojo	Párpado. Globo. Transparencia.	Ptosis. Exoftalmos, nistagmo. Opacidades.
Otros	Temperatura de piel y rectal. Lugar de inyección. Estado general.	Alta, baja. Hinchazón. Postura anormal, adelgazamiento.

los efectos inducidos o manifestados en la época prenatal, así como los que aparecen tras el nacimiento. Se incluyen los efectos embriotóxicos o fetotóxicos como disminución del peso corporal, retraso del crecimiento y del desarrollo, lesiones en los órganos, muerte, aborto, defectos estructurales (efectos teratogénicos), defectos funcionales, defectos peri-postnatales, trastornos en la lactancia, y problemas del desarrollo físico o mental tras el nacimiento hasta la fase de desarrollo de la pubertad normal, con inclusión de ésta.

Los estudios de teratogénesis requieren una minuciosa observación del esqueleto de los animales; el mejor sistema para ello consiste en tomar los animales recién nacidos o, mejor aún, fetos obtenidos por cesárea pocos días antes de la fecha prevista para el nacimiento, hacer transparentes los tejidos conjuntivos y colorear el esqueleto.

La operación de transparentar el feto supone mantenerlo en alcohol durante tres días, y pa-

sarlo a una solución de KOH al 2 por 100, hasta que los tejidos blandos se hagan traslúcidos, lo cual lleva de uno a tres días. Entonces se ponen los fetos en una disolución de colorante (normalmente sulfato de alizarina) en potasa hidroalcohólica. Después de uno o dos días se perciben los esqueletos bien teñidos, y los fetos se conservan en glicerina. De esta forma, puede examinarse perfectamente el esqueleto y detectar las principales anomalías. Estudios más profundos precisan la disección del animal.

Estudio del comportamiento animal

En el estudio farmacodinámico de sustancias psicotrópicas se han desarrollado técnicas para evaluar su efecto sobre el comportamiento de los animales.

El animal de elección para estos estudios es la rata, seguida de los primates, la paloma y otros. Antes de utilizar estos animales, se les

Tabla 11.7. PROTOCOLO DE ENSAYO

Especie _____								
Sexo _____								
F. Nac. _____								
Peso _____								
Pretratamiento	1	_____	Dosis	_____	Vía	_____	Fecha	_____
	2	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
	3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Tratamiento	1	_____	Dosis	_____	Vía	_____	Fecha	_____
	2	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
	3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Narcosis	Tiempo (minutos) tratamientos			
	1.º	2.º	3.º	4.º
Excitación				
Ataxia				
Caída				
Pérdida del reflejo de enderezamiento				
Reflejo plantar				
Analgesia				
Relajación muscular - masticadores - pata				
Taquipnea				
Bradipnea				
Hipotermia				
Flaccidez				
Reflejo palpebral				
Reflejo corneal				
Opacidad corneal				
Parada respiratoria				
Recuperación				
Automatismos				
Agitación				
Quejidos				
Tono muscular				
Sensibilidad cutánea				
Reflejo del enderezamiento				
Marcha normal				
Desaparición de la excitación				
Excreción				

Observaciones:

aísla, para impedir cualquier estimulación visual, auditiva, olfativa (feromonas), etc., en locales de ambiente controlado. Se les reduce la alimentación (incluso rebajándoles el peso al 80 por 100 del normal) para que se sientan gratificados por la comida (Tabla 11.8).

El método más sencillo para los estudios de comportamiento sería la simple observación del animal antes y después de suministrarle el tóxico, pero, lógicamente, no se conseguirán así parámetros objetivos. Pueden valorarse algunas capacidades como el ingenio, la memo-

Tabla 11.8. CONSUMO APROXIMADO DE ALIMENTOS Y AGUA

Especie	Edad	Peso	Alimento g/día	Agua ml/día
Aves dom.	8 sem.	500 g	200	200
Gato		2 kg	100	100
Cobayo		500 g	30	85
Conejo	1 año	2 kg	100	330
Hámster	14 sem.	125 g	15	85
Mono	2 años	5 kg	400	500
Oveja		100 kg	2,5 kg	
Paloma	8 sem.	500 g		
Pato	8 sem.	2,5 kg	250	500
Perro	4 sem.	10 kg	250	500
Rana		33 g		
Rata	3 sem.	50 g	15	25
Rata	14 sem.	250 g	20	25
Ratón	8 sem.	25 g	5	5
Vaca		500 kg	10 kg	

ria, etc., mediante el uso de laberintos; y para medir la resistencia a la fatiga se ha utilizado la rueda giratoria.

La ataxia es un trastorno de la coordinación que aparece en diversas alteraciones nerviosas; cuando se manifiesta al andar se denomina *ataxia locomotriz* (deambulación del borracho, etc.) y es un signo de incoordinación que puede objetivarse fácilmente (Soriano *et al.*, en prensa), como sigue:

Se impregnan las patas del animal con tinta de tampón y se le deja que circule por un túnel de madera de un metro de largo por 0,20 de ancho y de alto, cuyo suelo se cubre por una tira de papel; posteriormente se enlazan las huellas de cada paso con líneas que formarán las hipotenusas de sendos triángulos rectángulos (los catetos se dibujan en el sentido de la marcha y perpendicularmente a éste, formando entre sí ángulos rectos); se calculan las áreas obtenidas por los animales tratados y los testigos, y se evalúa la ataxia como el coeficiente de variación de la media de las áreas de los triángulos.

Paulatinamente se han ideado instrumentos que valoran objetivamente algunas facultades del animal y su modificación por las drogas. Uno de estos sistemas es el actímetro, que consiste en una placa sobre la que se pone el ani-

mal, y cuando éste se mueve cierra circuitos de bajísimo amperaje, inapreciables para el animal, pero que producen una señal que se registra gráficamente. El mismo resultado puede obtenerse mediante células fotoeléctricas; se determina así la actividad espontánea del animal y su comportamiento exploratorio.

Otro instrumento es el analgesímetro; consiste en una plancha caliente, que permite conocer inhibiciones de respuesta de retirada por disminución de la sensibilidad térmica. Objetivo similar posee otro artificio consistente en un habitáculo para el animal, que recibe calor en la cola, con intensidades variables; puede cronometrarse el tiempo de respuesta del animal a las señales.

Mediante una caja con dos compartimientos comunicados, puede medirse la capacidad de respuesta del animal para pasar de un lado a otro ante señales luminosas, sonoras o débiles estímulos eléctricos por la rejilla del suelo (en este caso, el animal realiza una respuesta de evitación).

Estos métodos pertenecen ya al grupo de estudios del condicionamiento operante. Se llama condicionamiento a un proceso de aprendizaje del animal, que puede reforzarse mediante una recompensa (comida o droga) cada vez que el animal realiza lo aprendido, o mediante un

castigo (descarga eléctrica), si no lo realiza, cuando recibe la señal luminosa o sonora. Merced a instrumentos electrónicos, cada vez más complejos, se pueden programar muy diferentes esquemas de señales y refuerzos, a tiempos variables, y exigir al animal una intervención muy activa, como la de pulsar palancas, en momentos críticos, como condición para que se produzca el refuerzo de gratificación o se impida el de castigo.

Después de repetir convenientemente el programa, en distintas sesiones, llega a obtenerse un perfil del comportamiento estable del animal, de tal manera que pueden conocerse estadísticamente cuáles son sus respuestas. Si entonces se introduce una nueva variable, como es la administración de un fármaco, podrá verse en qué orden afecta éste al comportamiento.

Este sistema es muy útil para el estudio de sustancias capaces de producir drogadicción, pues prontamente se descubrirá si se desarrolla una pauta de autoadministración.

MÉTODOS ALTERNATIVOS. TOXICIDAD *IN VITRO*

Son todos aquellos que se utilizan no para erradicar totalmente a los ensayos con seres vivos, ya que esto no es posible en buena lógica, sino para sustituir determinados ensayos *in vivo*, o como pruebas previas y de tanteos a éstos, o como estudios complementarios para mejorar la información y la especificidad de los estudios *in vivo*, e incluso para llegar a conclusiones que no permitirían éstos.

Pueden distinguirse las siguientes clases de métodos alternativos (Repetto y Repetto, 1995), según proporcionen:

1. Mejoras en los sistemas de almacenamiento, uso e intercambio de la información obtenida con los estudios *in vivo*, con el objeto de evitar la repetición de ensayos.

2. Mejoras en el diseño de los experimentos con animales, para aumentar la información obtenible de cada uno, y su validez, así como la aplicación de métodos estadísticos en el diseño y no sólo al final del estudio.

3. Modelos matemáticos para relacionar la estructura química con la actividad tóxica de los productos (QSAR), a pesar de que el estado de nuestros conocimientos con estos modelos no permita aún conclusiones definitivas.

4. Modelos educativos, como los audiovisuales, o las simulaciones mediante programas informatizados o computarizados, etc., que evitan utilizar animales en la docencia.

5. Estudios con humanos, como los epidemiológicos retrospectivos y los de toxicovigilancia, e incluso los ensayos con voluntarios, cumpliendo las normas éticas y legales correspondientes.

6. Métodos con técnicas *in vitro*, es decir, realizadas no sobre animales superiores, sino sobre cultivos de organismos inferiores (bacterias, algas, hongos) o de órganos, tejidos, células o fracciones subcelulares. Por el gran desarrollo que estos métodos están adquiriendo, debemos detenernos brevemente en su consideración (véase también el primer apartado de este capítulo).

El estudio de las transformaciones metabólicas y procesos de toxicidad y desintoxicación de un compuesto químico puede realizarse no ya utilizando un ser vivo entero, sino tan sólo un órgano aislado o una pequeña porción del mismo o, incluso, un cultivo de células. De esta manera puede conocerse mejor las biotransformaciones que introduce cada órgano, la capacidad de éste en cada caso y circunstancias, y sus características funcionales, como respiración celular, síntesis proteica y depósitos grasos. Además, el sistema permite obtener mezclas catabólicas menos complejas que las que proporcionan las excretas normales de heces y orina, para identificar metabolitos. Esta experiencia *in vitro* posibilita establecer unas condiciones, que pueden controlarse, especialmente adecuadas al estudio de los mecanismos de acción de los tóxicos a nivel celular y subcelular, y forma parte de los llamados *procedimientos alternativos* que se proponen para disminuir el empleo de animales de experimentación.

Una forma, cada vez menos empleada, de realizar estos estudios puede ser la utilización del órgano (hígado, corazón, pulmón, riñón, etc.)

sin extraerlo del animal, que se mantiene vivo, pero aislando la víscera de la circulación general. Se reproduce artificialmente la circulación, sustituyendo la sangre por un medio salino enriquecido con albúmina, eritocitos, etc., que se inyecta por la arteria de irrigación del órgano, y se recoge de la vena de salida. Para esto suelen utilizarse órganos de animales como perro o gato, y hasta tan pequeños como la rata.

La perfusión también puede realizarse con órganos enteros extraídos del animal, y últimamente se están empleando órganos no patológicos de cadáveres humanos, de manera que se eviten los inconvenientes de transportar al género humano los resultados obtenidos con animales.

Otro tipo de experimentación emplea cultivos de órganos; para ello se obtienen trozos del órgano, que reciben el nombre de «explantes», y que son suficientemente finos para permitir la penetración por difusión del líquido de cultivo, con el oxígeno disuelto, pero bastante gruesos para que resulte pequeña la proporción de células dañadas por el corte. Lamentablemente, el órgano más difícil de cultivar es el hígado, como consecuencia de su propia actividad metabólica.

La técnica general consiste, en esencia, en perfundir la preparación histológica, en condiciones estériles, con un medio nutritivo y el tóxico en estudio. La operación se realiza en cubetas termostáticas cerradas, con entradas para el líquido fisiológico, el tóxico y oxígeno; posee también electrodos de estimulación o de medidas de pH, sensor de oxígeno y anhídrido carbónico, etc. El líquido perfundido se extrae y se analiza continuamente, y al final puede efectuarse el estudio histológico de la muestra.

Los cultivos de células disgregadas requieren un tratamiento del corte histológico con tripsina; después las células se multiplican en capas monocelulares, que se adhieren a las paredes del recipiente de cultivo, y ello permite la observación microscópica directa. Incluso es posible trabajar con células que naturalmente viven aisladas, como son los linfocitos y los protozoos. Sobre ellos puede estudiarse el efecto de los tóxicos en la síntesis del ARN y de proteínas, desarrollo, proliferación, diferencia-

ción, etc. También se utilizan células tumorales, como las Hela, y bacterias.

El método de centrifugación llamado «elutriación» permite separar células de distinto tipo, e incluso de diferente estado de desarrollo. Finalmente, la centrifugación diferencial permite obtener fracciones subcelulares, como membranas, microsomas, mitocondrias, polisomas, sobre las cuales poder investigar aisladamente la acción del tóxico.

En los modelos *in vitro* deben distinguirse dos componentes fundamentales: *a)* el sustrato biológico, y *b)* los indicadores de toxicidad.

Al sustrato biológico nos hemos referido más arriba, y es el material orgánico, vivo o no, que se mantiene en el laboratorio en determinadas condiciones (*in vitro*), para estudiar las reacciones que sobre él produzca el xenobiótico que se ensaya. Estas reacciones se valoran mediante los indicadores de toxicidad, que son parámetros elegidos por su representatividad del efecto o alteración que se quiere observar. Los estudios *in vitro* utilizan una *batería de indicadores*, complementarios o confirmatorios entre sí.

Determinados indicadores revelan la capacidad citotóxica general de los xenobióticos: son los que valoran la viabilidad, la morfología y la reproducción celular, o la actividad metabólica, integridad de las membranas celulares y subcelulares, etc. Otros indicadores son específicos de órganos, sistemas o funciones, como, por ejemplo, actividad de receptores, síntesis, almacenamiento o liberación de determinadas enzimas, transmisores o anticuerpos, captación de precursores, etc. En ocasiones los indicadores se eligen atendiendo a las actividades previstas del xenobiótico que se va a ensayar, en cada caso.

A pesar de todos estos progresos técnicos que nos permiten esclarecer los procesos tóxicos a niveles cada vez más profundos, no puede olvidarse la observación del animal intacto y los tejidos *in vivo* para no sobrevalorar resultados obtenidos en condiciones, en gran medida, artificiales.

Los métodos para probar la capacidad mutagénica, cancerígena o teratogénica de las sustancias consisten en investigar efectos ger-

mínales o somáticos, por más de un procedimiento, y se dividen en:

a) *Melados in vitro*: son rápidos, y pueden ser:

a.1. Bacterianos: que utilizan preferentemente salmonelas o *E. coli*, de cepas auxotrofas. que para crecer precisan la adición al medio de cultivo de una sustancia determinada:

Prueba de Ames (histidina).

Prueba de Ara (1-arabinosa).

a.2. No bacterianos con:

Mosca *Drosophila*.

Células de médula ósea.

Micronúcleos. Etcétera

a.3. Electroforéticos con ADN bacteriano.

b) *Métodos in vivo*: aplicación cutánea, subcutánea o pulmonar del producto en animales. Son de realización a largo plazo.

Para estudiar la embriotoxicidad y teratogenicidad de los compuestos pueden usarse los huevos de las aves (gallina, pato, etc.). Los huevos fecundados se incuban en estufa, y hacia el séptimo día se inyecta en el saco vitelino (Fig. 11.3), observando por transiluminación. 0.05 ml de una disolución o emulsión del pro-

ducto en suero salino estéril: al final del periodo de incubación se compara, frente a un lote de huevos sin tratamiento, el número de pollitos nacidos y los que sobreviven, y se buscan posibles malformaciones. Este ensayo tiene la característica de que en el huevo la biotransformación del xenobiótico es mínima, por lo que los efectos observados no pueden deberse a metabolitos.

Métodos de toxicología molecular

Los estudios de toxicología molecular se realizan con procedimientos *in vivo*, *in vitro* y con combinaciones de ambos.

El rápido desarrollo de nuevos métodos en biología molecular permite incrementar enormemente nuestro conocimiento de las interacciones químicas y el efecto sobre los procesos de control celular. Aunque hasta el momento estas técnicas se han reservado para estudios mecanísticos. en un futuro se integrarán entre los descriptivos y los reguladores. Una vez comprobadas las implicaciones de diferentes genes en la inducción o evitación de las mutaciones y el cáncer, se están relacionando diversos efectos tóxicos con los polimorfismos genéticos en enzimas y receptores, con la in-

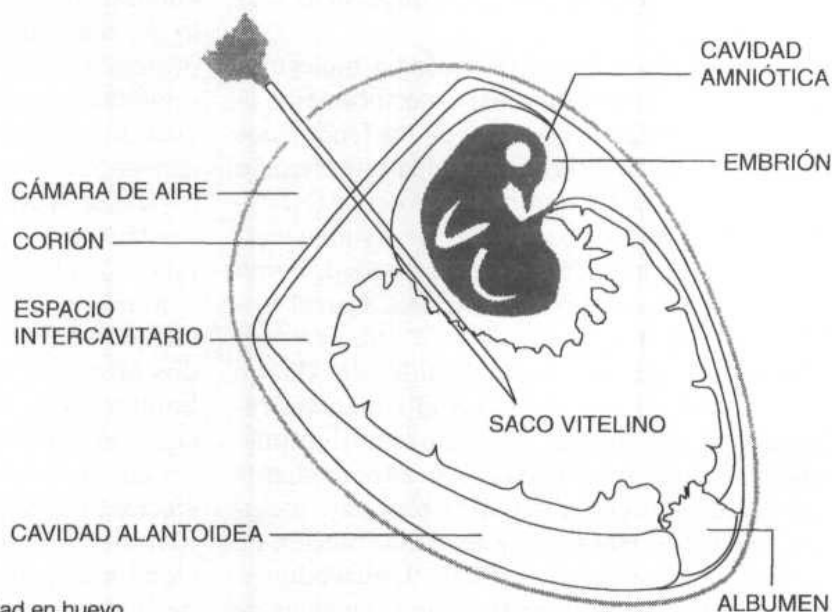


Figura 11.3. Ensayo de embriotoxicidad en huevo.

ducción de diferentes marcadores de estrés, reguladores del ciclo celular y la diferenciación celular, de las interacciones intercelulares, de la expresión de receptores, de la apoptosis, etc. En el capítulo de mecanismos de toxicidad se citó el ejemplo del receptor Ahr de los hidrocarburos aromáticos, y su interacción con un fragmento de un gen, y también la participación de genes en la apoptosis, etc.

Como modelos experimentales pueden utilizarse componentes celulares aislados, incluyendo enzimas, receptores, sinaptosomas, liposomas, membranas o ADN. Dado que no es siempre posible obtener material humano, pueden construirse bacterias o líneas celulares transgénicas en las que la introducción de genes humanos que expresen una proteína, enzima o receptor de interés toxicológico, permita reproducir, al menos en parte, la situación humana, incrementando la predictividad de los efectos tóxicos sobre el hombre, o modificando las vías metabólicas que aumentan la sensibilidad hacia determinados efectos. Otras posibilidades son la utilización de vectores introducidos en células de mamíferos, que son posteriormente rescatados y transferidos a bacterias para distinguir mutaciones, y la introducción de elementos respuesta o informadores que se activan en determinadas condiciones, lo que permite utilizarlos como detectores celulares (p. ej., emisión de luz, expresión de una enzima, etc.).

Además, las técnicas de biología molecular permiten no sólo comprobar específicamente la afectación tóxica del ADN y de los fenómenos de transcripción y traslación de la información genética a una determinada proteína (ADN-ARN-proteína), sino que también ayudan a establecer relaciones estructura-actividad, como en el caso del estudio de receptores. Con el empleo de sondas específicas para una determinada secuencia de oligonucleótidos de ADN o ARN, se detectan éstos usando mareaje radioactivo, enzimático, o con quimioluminiscencia. Mayor sensibilidad se alcanza mediante amplificación con diferentes técnicas, incluyendo las diversas variedades de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizando enzimas específicas de restricción y técnicas de

secuenciación se identifican las posibles variaciones en la secuencia de las bases de cada gen. La expresión proteica, especialmente importante para las enzimas, los receptores y los mediadores de los diversos procesos celulares, se evalúa por técnicas inmunológicas (ELISA, inmunocitoquímica), y la actividad funcional, mediante técnicas bioquímicas clásicas.

CORRELACIÓN ENTRE LA TOXICIDAD ANIMAL Y LA HUMANA. TOXICOLOGÍA COMPARATIVA

Se ha efectuado amplísima investigación para tratar de determinar esta correlación, y se ha llegado a la conclusión de que ningún animal, ni siquiera el primate, responde a los tóxicos exactamente igual que el hombre, pero que la mayoría de los efectos que experimentan los animales de laboratorio bajo la acción de los fármacos los manifiesta también el hombre, y a la inversa. Si se exceptúan aquí los procesos inmunitarios, que son distintos, en general, las diferencias son más de tipo cuantitativo que cualitativo (véase cap. 8).

Parece que las diferencias interespecies se deben a variaciones toxicocinéticas y de biotransformación de los tóxicos, y aunque se pueden encontrar distintos metabolitos en la orina de animales de diferentes especies, se ha visto que lo que más varía entre éstas es la proporción de proteínas séricas transportadoras, la biodisponibilidad y la vida media de eliminación, pero cuando se administran grandes dosis, los mecanismos cinéticos se saturan y las diferencias tóxicas se acortan.

Algunos autores (Litchfield, 1962), comparando 89 efectos de 6 tóxicos sobre rata, perro y hombre, llegaron a la conclusión de que: cuando un efecto no aparece en ninguna de las dos primeras especies, tampoco lo hará en el hombre, pero, si el tóxico afecta a una sola de aquéllas, también afectará al hombre.

Otro autor (Krasovskii, 1976), estudiando los efectos de 278 productos sobre 6-10 especies de mamíferos demostró que existe una correlación lineal entre el log del peso corporal medio de la especie y el log de la DL-50 de cada tó-

xico. Se ha tratado de aplicar esta correlación para deducir la DL mínima estimada para humanos, a partir de las DL-50 en animales; así Edwards y cols. (1984) utilizaron los datos correspondientes a los siete productos que causan más intoxicaciones en Gran Bretaña, y comprobaron que las DL calculadas para humanos coinciden con los valores conocidos a partir de intoxicaciones reales, aunque, como también han visto otros autores, este sistema es válido siempre que se utilicen datos de, al menos, tres o cuatro especies de mamíferos.

Independientemente de todos los factores diferenciales ligados a la especie, debe tenerse en cuenta que gran parte de las observaciones que se extraen de los animales no son, generalmente, los síntomas (manifestaciones de las alteraciones fisiopatológicas) de la intoxicación, sino sólo los signos, es decir, los síntomas perceptibles por un observador. Por ello, muchas reacciones que fácilmente se producen en el hombre, como dolores, náuseas, vértigos, trastornos visuales, fotosensibilidad, tinnitus (sensación subjetiva de campanilleo), etc., no pueden detectarse en los animales.

ESTIMACIÓN DEL RIESGO

Como se ha visto, los estudios de toxicología experimental tienen dos objetivos fundamentales: *a)* conocer la toxicidad, efectos y mecanismos de acción de las sustancias sobre los seres vivos, así como la forma de combatir estos efectos, y *b)* evaluar el riesgo que la incidencia de tales sustancias puede producir sobre las poblaciones.

La evaluación o previsión del riesgo es uno de los principales objetivos de los organismos e instituciones implicados en proteger a la población de los efectos de las sustancias, y supone el conocimiento de las relaciones cualitativas y cuantitativas entre los riesgos y los beneficios que se deriven de la exposición a las sustancias químicas (Fig. 11.4).

Recordemos que *riesgo* es la probabilidad de que se produzcan efectos adversos o daños por exposición a un agente, como consecuencia de las propiedades del mismo y de las circunstan-

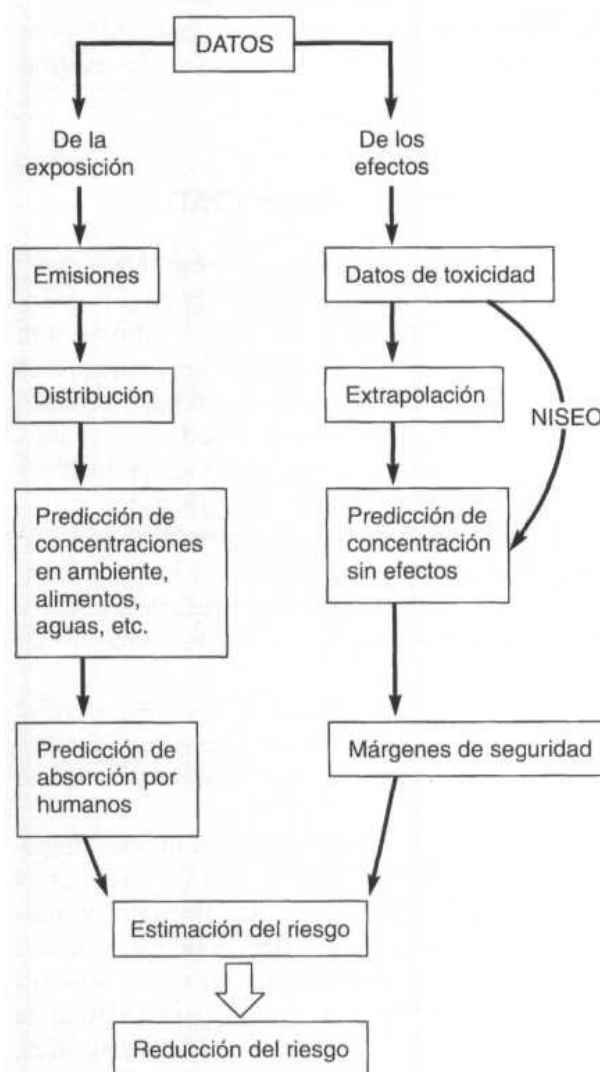


Figura 11.4. Etapas en la estimación del riesgo consecuente a la exposición a los agentes físicos y químicos. (Modificado de RIVM, 1994.)

cias o grados de la exposición. Por *determinación del riesgo* se entiende la identificación y cuantificación de los posibles daños, lo que supone el establecimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta; cuando estas consideraciones se cuantifican relacionándolas con los niveles del tóxico a que pueden estar, o llegar a estar expuestos o absorber las poblaciones, hablamos de *estimación del riesgo*. Una vez efectuada ésta, se pueden deducir recomendaciones para reducir el riesgo, por disminución de los niveles permisibles de exposición o absor-

ción, los tiempos de exposición o incluso la limitación o prohibición del uso de las sustancias.

FACTORES DE SEGURIDAD

Al extrapolar al hombre los resultados experimentales con animales, o los datos procedentes de un pequeño número de individuos a una gran población, se presentan incertidumbres difíciles de resolver. Para ello se ha propuesto aplicar unos factores de seguridad que van de 1 a varios miles, con los que se divide la dosis experimental para admitirla como segura.

Cuando los datos se han obtenido con humanos, si el riesgo previsible no es muy grande y cuando la población presumiblemente expuesta tampoco lo es, se aceptan factores de 1 a 5.

En los casos en que los datos proceden de animales, si el riesgo es grande y si se supone que va a estar expuesta la población general, se propone un factor de 1.000.

Para los aditivos alimentarios no carcinógenos, se acepta dividir por 100 (10 por ser el hombre más sensible que los animales y nuevamente por 10, para cubrir la heterogeneidad del género humano) la dosis sin efecto adverso observable (DSEO, NOAED) para calcular la ingesta diaria admisible (IDA) (Vettorazzi, 1977).

Se han propuesto varios procedimientos para extrapolar los resultados experimentales y obtener una dosis límite que sea inferior a la requerida para producir efecto. De estos modelos son de destacar los basados en la regla del peso corporal, el impacto singular y el probit.

La regla del *peso corporal* admite que los logaritmos de las variables o parámetros biológicos de los mamíferos muestran una regresión lineal con los logaritmos del peso corporal, lo que parece cumplirse también para los efectos producidos por los tóxicos (Krasovskii, 1976). El *método probit* produce curvas cóncavas con dosis bajas y es menos prudente que el modelo del impacto singular, aunque exige un límite superior de confiabilidad del 99 por 100, y una línea que, pasando por éste, tenga una pen-

diente P igual a 1, que supone 1 probit por cada amplitud 10 de dosis.

El *modelo del impacto singular* (Hoel, 1975) presupone que cada efecto se debe a la acción de una unidad eficaz de dosis sobre un receptor singular; equivale al modelo lineal dosis-efecto. Para desarrollarlo se determina el límite superior de confiabilidad (LSC) del 99 por 100 para el efecto observado a una dosis dada (d), y se establece el límite deseado para el efecto (E), por ejemplo 1 en 1.000.000. Entonces, la dosis D que produciría un efecto que, con probabilidad del 99 por 100, sea inferior a E viene dada por:

$$D = \frac{d \cdot E}{LSC}$$

REGLAMENTACIONES SOBRE LA EXPERIMENTACIÓN TOXICOLÓGICA

En los últimos tiempos están apareciendo normativas legales que afectan a la experimentación toxicológica, incidiendo sobre ella desde dos flancos distintos.

Por un lado, la legislación internacional exige que cualquier nueva sustancia que vaya a ser puesta en el mercado sea objeto de una «declaración» con un amplio estudio de sus características físico-químicas, analíticas, toxicológicas y ecotoxicológicas (difusión, persistencia y efectos sobre los ecosistemas).

La primera ley norteamericana para reglamentar las sustancias químicas es la Food and Drug Act, de 1906; y de 1927 la Federal Cautic Poison Act, que en 1938 se convirtió en la Food, Drug and Cosmetic Act, en 1976 en la Toxic Substances Control Act (TOSCA) y en 1986 en la Chemical Substances Control Act. La supervisión de la evaluación toxicológica de estas sustancias, el registro y autorización para su comercialización, así como los niveles de aditivos e impurezas en alimentos, etc., es realizada por la Food and Drug Administration (FDA, 1938); estas funciones respecto a los plaguicidas y la contaminación del aire y las aguas corresponde a la Environmental Protection Agency (EPA, 1970).

Hacia 1970 la FDA norteamericana discrepó

con una importante compañía farmacéutica sobre los estudios de toxicidad realizados a un producto antiprotozoario. Como consecuencia, se inició una minuciosa revisión de los protocolos seguidos por aquel y otros laboratorios farmacéuticos, que condujo a denuncia judicial y condena de cárcel para algunos investigadores (Internal Memo, Health Education and Welfare, Searle Investigation Task Force Final Report, Washington, 1976). Todo ello produjo una gran conmoción, pues se pensó que lo descubierto podría no ser más que la «punta de un iceberg», por lo que la FDA elaboró unos principios o códigos (FDA. Federal Register, USA. Nonclinical laboratory studies. Good Laboratory Practice Regulations, 1978), que han sido adaptados o incluidos en las legislaciones de todos los países.

La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), creada en París en 1960 e integrada por 24 países, incluidos EE.UU. y Japón, publicó en 1981 las normas para la realización de la evaluación toxicológica de las sustancias, de forma que los datos sean mutuamente aceptados por los distintos países, y en 1982 la norma de buenas prácticas de laboratorio, para la realización de tales estudios.

Por su parte, la Comunidad Económica Europea (CEE, creada por el Tratado de Roma, en 1957), y denominada después Unión Europea (UE, 1993), publicó en 1967 su normativa básica para clasificación, empaquetado y etiquetado de sustancias peligrosas, posteriormente adaptada y actualizada en varias ocasiones, obligando con ello a la armonización de las legislaciones de los países comunitarios.

En relación con las buenas prácticas de laboratorio, la Directiva 87/18/CEE aplica a la Comunidad Europea la normativa de la OCDE, disponiendo su cumplimiento por los Estados Miembros antes del 30 de junio de 1988, y la 88/320/CEE establece las formas de inspección.

Estos principios se conocen como Código de Prácticas Correctas de Laboratorio (en inglés GLP) y recogen todos los requisitos exigibles para que un estudio experimental sea homologable o aceptable no sólo por el propio país, sino

también en el extranjero (reconocimiento mutuo), y no se circunscribe a la toxicología experimental, sino que afecta también a los certificados de análisis de composición, farmacocinéticos, bioensayos, etc. Los requisitos se refieren a la capacitación y cualificación del personal, métodos operativos (con especial

Tabla 11.9. NORMATIVAS DE OCDE, CE, CEE, PARA LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL. BASES DE LAS PRÁCTICAS CORRECTAS DE LABORATORIO (GLP)

Animales:

Estirpe normalizada, proveedor de garantía.
Prohibición uso animales errantes o domésticos.
Estabulación independiente de especies.

Animalarios:

Barreras sanitarias
Pasillos independientes de «servicio» y «limpios».
Paredes, techos y suelos sin rincones ni hendiduras.
Temperatura: roedores: 20-24° C, otros: 15-21° C.
Humedad: 55 % ± 10 (límites: 40-70 %).
Ventilación: 15-20 renovaciones/hora, con 15 mm de presión positiva en zonas de animales y 10-5 mm en pasillos y servicios.
No corrientes aire.
No recirculación aire.
Iluminación uniforme, en fases de 12 horas.
Máximas prácticas higiénicas del personal (tipo quirófano).

Cuarentenas:

Roedores: 5-15 días.
Otros: 20-30 días.

Supervisión sanitaria:

Personal competente titulado.

Espacio mínimo por animal:

Rata: 350 cm²; perro: 1 m², más 1 m² de parque.

Alimento y cama:

Controlados.

Dispositivos de alarma:

Para casos de incendio, fallos de ventilación, etc.

Otras:

Programa de lavados y esterilizaciones del animalario.
Reducción máxima del sufrimiento de los animales y sacrificio bajo anestesia, siempre que sea posible.
El trabajo con animales SPF o GF incrementa exigencias de esterilidad (aire, cama, alimentos, etc.).

atención a los controles de calidad), instalaciones, archivos y registros, etc.

En lo que se refiere a los bioterios o animales las GLP exigen la instalación de barreras sanitarias, pasillos limpios y de servicio independientes, aire filtrado, con temperatura, humedad y ventilación controlada, etc. (Tabla 11.9).

La legislación española se ha desarrollado así:

El Real Decreto 2218/1985, modificado por el R.D. 1078/1993, contiene el Reglamento sobre Declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias pe-

ligrosas (trasposición de las directivas 92/32/CEE, y 93/101/CE).

La Directiva 86/609/CE, que establecía protección a los animales, procurando limitar el número de los empleados y la duplicidad de estudios, etc., dio lugar al R.D. 223/1988.

El Real Decreto 822/1993 dispone el cumplimiento de los códigos de buenas prácticas de laboratorio, que en principio se referían principalmente a los trabajos con animales y posteriormente se han extendido a todos los trabajos experimentales, es trasposición de la Directiva 87/18/CE. La vigilancia e inspección del cumplimiento de estas disposiciones han

Tabla 11.10. REFERENCIAS LEGISLATIVAS DE LA UNIÓN EUROPEA Y ESPAÑA. EN RELACIÓN CON LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

Materia	Directiva europea	Real Decreto español
Clasificación de las sustancias químicas en general (6. ^a enmienda) (7. ^a enmienda)	67/548/CEE	R. D. 2218/1985
	79/831/CEE	
	92/32/CEE	R. D. 1078/1993
	93/101/CEE	R. D. 363/1995
	96/54/CE	
Clasificación de preparados peligrosos.	88/379/CEE	
	91/155/CEE	R. D. 1078/1993
Protección de los animales. Método de dosis fija. Métodos alternativos.	86/609/CEE	R. D. 223/1988
	92/69/CEE	
	94/606/CEE	
Buenas prácticas de laboratorio.	87/18/CEE	R. D. 822/1993
Vigilancia e inspección de su cumplimiento.	88/320/CEE	R. D. 2043/1994
Evaluación de toxicidad de los medicamentos.	65/651/CEE	
	75/318/CEE	
	91/507/CEE	R. D. 767/1993
	93/39/CEE	R. D. 2000/1995
Evaluación de toxicidad de los plaguicidas.	78/631/CEE	R. D. 3349/1983
	91/414/CEE	R. D. 2163/1994
	94/37/CEE	
	94/43/CEE	O. M. 20-11-95
	95/35/CEE	O. M. 29-11-95
	95/36/CEE	O. M. 11-12-95
Evaluación de efectos ecotóxicos de los plaguicidas.	96/12/CE	
Evaluación de la toxicidad de cosméticos (métodos <i>in vitro</i> desde 1988).	76/768/CEE	R. D. 349/1988
	93/35/CEE	R. D. 1415/1995
	6. ^a mod.	
	94/32/CEE	O. M. 8-6-95

sido establecidos por el R.D. 2043/1994 (Directiva 88/320/CEE).

Finalmente indicaremos que la más reciente Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, que incluye su clasificación toxicológica, es el R.D. 2163/1994 (directivas 91/414/CEE, 94/37/CEE, 94/43/CE y 95/35 y 36/CEE) recogidas por varias órdenes ministeriales de diciembre de 1995; y la correspondiente a los medicamentos (ensayos preclínicos) el R.D. 767/1993 (directivas 75/318/CEE, 91/507/CEE).

Para los medicamentos, la CEE (febrero de

1983 y febrero de 1984) ha recomendado la duración mínima que deben tener los estudios en función del tiempo que esté previsto que los enfermos deban recibir la medicación. Así: cuando los pacientes deban tomar solamente una dosis del medicamento en días aislados o esporádicos, el estudio con animales debe abarcar al menos dos semanas. Si la medicación puede continuarse hasta una semana, el estudio debe ser superior a un mes, y si está previsto que la medicación dure un mes, el estudio debe superar los tres meses. Cuando se estime que la administración del medicamento a un paciente puede superar los 30 días, o sumar 30

Tabla 11.11. PRINCIPIOS ÉTICOS DE LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL. INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. COMITÉ NACIONAL DEL ICLAS

Principios básicos

- Artículo 1.* Los progresos del conocimiento humano son necesarios y sobre todo los de la biología, de la medicina del hombre y de los animales.
- Artículo 2.* El hombre tiene necesidad de utilizar el animal en la búsqueda del conocimiento humano igual que para alimentarse, vestirse y trabajar. De ahí el deber de respetar al animal, ente auxiliar y ser viviente común a él.
- Artículo 3.* Toda persona que emplee animales con fines experimentales debe tener presente que están dotados de sensibilidad y memoria y son susceptibles al dolor y al sufrimiento.

Responsabilidad del experimentador

- Artículo 4.* El experimentador es moralmente responsable de sus actos en el marco de la experiencia animal.
- Artículo 5.* Las experiencias concernientes a los seres vivos y las extracciones de tejidos a sujetos vivos con fines de investigación deben ser realizadas por un científico cualificado o bajo su control directo. Las condiciones de conservación de los animales en experimentación deben ser definidas y controladas por un veterinario o por un científico competente.
- Artículo 6.* En los estudios sobre la utilización de animales debe existir una probabilidad razonable para que estos estudios contribuyan de manera importante a la adquisición de conocimientos que desembocarán eventualmente en la mejora de la salud y del bienestar del hombre y de los animales.
- Artículo 7.* Los métodos estadísticos, los modelos matemáticos y los sistemas biológicos *in vitro* deben ser utilizados cuando sean apropiados para completar la experimentación animal y para reducir el número de los sujetos utilizados.
- Artículo 8.* El experimentador debe utilizar el animal adaptado a su investigación y tener en cuenta también los grados sensoriales y psíquicos propios de cada especie. Los animales en peligro de extinción no deberán ser utilizados más que en circunstancias excepcionales muy definidas. Mientras sea posible, los animales utilizados en el laboratorio provendrán de criadores especializados para asegurar las mejores condiciones de equilibrio biológico.
- Artículo 9.* El experimentador debe velar por que las condiciones de conservación del animal de laboratorio sean las mejores posibles, y aportar los cuidados necesarios antes, durante y después de las intervenciones.
- Artículo 10.* El experimentador tiene el deber de ahorrar al animal todo sufrimiento físico o psíquico inútil. Debe poner en marcha los métodos que permitan limitar el sufrimiento y los dolores en el caso o casos que sean inevitables.

días en un año, la experimentación animal debe prolongarse durante más de 6 meses.

Frente a estas normativas que requieren concienzudos estudios, realizados en las mejores condiciones materiales y científicas y con suficiente número de animales tratados y controles como para que los resultados puedan ser considerados estadísticamente significativos, se publican otras reglamentaciones que regulan el empleo de animales de experimentación, tratando de reducir el número de éstos. Así, el convenio suscrito por los estados miembros del Consejo de Europa «para la protección de vertebrados utilizados para fines experimentales y científicos» tiene como objetivos la reducción de los animales utilizados en los laboratorios y el empleo de procedimientos que eviten los sufrimientos a los mismos, así como propugna el desarrollo de métodos alternativos que no requieren el uso de animales (Tabla 11.11).

En dicho convenio se contemplan todas las

características de salud y bienestar que han de gozar los animales de laboratorio, los métodos de anestesia y sacrificio, prohibiciones sobre diferentes manipulaciones, etc., el personal que puede realizar las investigaciones y las autorizaciones que deben obtenerse para ello.

Además de las dos reglamentaciones externas o superiores citadas están cobrando gran interés unas normas previstas en las GLP que, con carácter interno, establece cada laboratorio (como ejemplo, la expuesta en la Tabla 11.12) para racionalizar y hacer rutinario todo el trabajo con los animales. Se designan en inglés «Standard Operating Procedures» (SOPs), lo que podría traducirse como procedimientos operativos (o de trabajo o funcionamiento) normalizados (PTN). Estas normas contemplan numerosas y minuciosas recomendaciones que, claramente redactadas y colocadas frecuentemente en la pared de cada lugar de trabajo y libretas de laboratorio, abarcan desde

Tabla 11.12. NORMAS PARA PREPARACIÓN, MANEJO Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS EN LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

1. En toda la planta de experimentación no se debe fumar, beber, comer (caramelos, chicles, etc.), ni aplicarse cosméticos.
2. Lavarse las manos con jabón desinfectante.
3. Usar siempre guantes, mascarilla, gafas, bata distinta y calzado especial o «puppies».
NOTA: Si se perfora un guante, quitárselo inmediatamente, lavarse las manos y ponerse uno nuevo.
4. Colocar sobre la mesa de trabajo una hoja de papel absorbente donde se harán todas las manipulaciones. Cuando se trabaje con material en polvo, humedecer el papel.
5. El pesado, la disolución de los productos y de las distintas dosificaciones se harán con la mayor asepsia y en vitrina. Las cantidades que se vayan a aplicar por animal o día se repartirán en ampollas o viales y se conservarán hasta su utilización en nevera y protegidos de la luz. Los frascos y ampollas se mantendrán abiertos el menor tiempo posible.
6. En el momento de la administración la apertura de las ampollas y frascos se hará en condiciones de asepsia; limpiar el cuello con gasa humedecida con alcohol; con la misma gasa se sujetará la ampolla o frasco al abrirla.
7. Las jeringuillas, agujas, mariposas, sondas, deberán ser estériles y se evitará en todo lo posible su contacto con el aire, la mesa, etc.
8. Durante toda la manipulación se evitará la formación de espuma y aerosol (no inyectar aire, no separar la aguja de la jeringuilla, etc.).
9. Se evitará el contacto con orina y heces de los animales tratados.
10. Todo el material desechable utilizado, papel absorbente, gasas y heces, etc., se introducirá en bolsas de plástico para su incineración.
11. El material no desechable que contenga restos de producto se enjuagará inmediatamente bajo el chorro de agua para su fregado posterior.
12. La mesa de trabajo se fregará con agua y jabón o productos descontaminantes y se enjuagará con agua abundante.
13. Lavarse las manos con jabón desinfectante.

las normas para identificar y etiquetar a los animales, su examen sanitario, alimentación, manejo, etc., hasta las situaciones en que el personal auxiliar debe consultar al superior, y su principal objetivo es el de evitar errores por distracción, olvido o falta de motivación del personal o cualquier otra causa, de forma que se garanticen al mayor porcentaje posible las conclusiones que se extraigan de cada ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson D. Conning DM. *Experimental toxicology*. 2.^a ed. Cambridge: Royal Soc. Chem., 1993.
- Baker S. *The conelation of adverse effects in man with observations in animáis*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1971.
- Balls M. Riddell R, Worden A. *Animáis and aher-natives in íoxicology lesting*. New York: Academic Press, 1983.
- Blackman D. *Operant conditioning*. London: Methuen&Co., 1974.
- Castel JV. Gómez-Lechón MJ. *In vitro altematives to animal pharmaco-toxicology*. Madrid: Serie científica. Farmacoindustria, 1992.
- CEE. *Teclmical guidance on risk assessment ofexis-ting substances*. Bruselas: 1994.
- Davey D. *Advances in toxicological melhology*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1965.
- Davey D. *Experimental studies and clinical expe-rience*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1965.
- Diener W. Siccha L. Mischke U. Kayser D, Schlede E. The biometric evaluation of acute-toxic-class method. *Ardí Toxicol* 1993; 68:599-610.
- Duncan W. *Experimental model systems in toxicology and their signijicance in man*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1974.
- Duncan W, Leonard B, Brunand M. *The predictiun ofefhronic toxicity from short temi studies*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1976.
- Eider RL. *Cosmelic ingredients. Their Safety assess-ment*, 1980.
- Fan AM, Chang LW. *Toxicology and risk assess-ment*. New York: Marcel Decker, Inc., 1996.
- Fielder RJ. *The jixed dose procednre as an alterna-tive to he classical LD-50*. Baltimore: World Cong-res Tox, 1994.
- Finney DG. *Probil analysis*. 3.^a ed. London: Cam-bridge University Press, 1971.
- Gad S, Weil CS. *Statistlics and expeñemental design for loxicologists*. The Telford Press, 1986.
- Gay W. *Methods od animal experimentation*. Vols. 1-4. Nueva York: Academic Press, 1965.
- Gorrod JW. *Testing for toxicity*. London. Taylor & Francis, 1986.
- Hayes AW. *Principes and methods of toxicology*. 3.^a ed. New York: Raven Press, 1994.
- Hoel D. *el al*. Estimation of risks of irreversible de-lay toxicity. *J Tox Env Health*. 1975; 1(1):133.
- Krasovskij GN. Extrapolation of experimental data from animal to man. *Environ Health Perspect*. 1976; 13:51-58.
- Lewi PJ, Marsboom RP. *Toxicology reference data wistar raí*. Amsterdam: Elsevier, 1981.
- Li *el al*. (eds.). *Toxicity Testing- New approaches and applications in human risk assessment*. New York: Raven Press, 1986.
- Liu D, Dutka BJ. *Toxicity screening procedures using bacterials systems*. Suiza: Marcel Dekker. AG. VerlagPub, 1984.
- Lorke D. A new apprach to practical acute tocity testing. *Arch Toxicol*, 1983; 54:275-287.
- Melby E, Altman N. *llandbook of laboratory animal Science*. Vol. 1-3. Ohio: CRC Press, 1974.
- OCDE. *Lignes diretices pour les essays de Produits chimiques*. París: 1981.
- OCDE. Étude combiné de toxicité a doses répétéés et de despistage de la toxicité pour la reproduction et le developpement. n.º 422. 1996.
- OCDE. Toxicité orales aiguë. Méthode par classe de toxicité aiguë, n." 423. 1996.
- OMS-PNUMA. *Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias quimicas*. Publicación núm. 402, 1980.
- Paget G. *Methods in toxicology*. Oxford: Blackwell Scientific Pub. 1970.
- Paget GE, Thomson R. *Standard operating proce-dures in pathology*. Lancaster: MTP Pres. 1979.
- Repetto G, Repetto M. Métodos alternativos: estu-dios toxicológicos *in vitro*. En: Repetto, M. (ed.) *Toxicología avanzada*. Madrid: Díaz de Santos, 1995.
- Repetto M. Ética de la experimentación animal. *Rev deToxicol*, 1989; 6(2): 185-193.
- RIVM. *Uniform system for evaluation of substances*. The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection. 1994.
- Russel WMS, Burch RL. *The principes of human experimentation techniques*. London: Methuen, 1959.
- Sanz P, Rodríguez-Vicente MC, Villar P, Repetto M. Uncontrollable atmospheric conditions wich can affect animal experimentation. *Veter and Hum Toxicol*, 1988; 30(5):452-454.
- Salsburg DS. *Statistlics for toxicologists*. New York: Marcel Dekker, 1986.

- Schledc E, Mischke U, Diener W, Kayser D. The international validation study of the acute-toxic-class method (oral). *Arch Toxicol*, 1994; 69:659-670.
- Sword IP, Thomson R. *Standard Operating Procedures in vitro Toxicology*. Lancaster: MTP Press, 1980.
- Thompson T, Shuster, Ch. *Behavioural pharmacology*. Londres: Prentice-Hall, 1968.
- Trevan JW. The error of determination of toxicity. *Proc Royal Soc*, 1927; 101B:483-514.
- Van den Heuval MS, Dayan AD, Shillaker RO. Evaluation of the BTS approach to the testing of substances for their acute toxicity. *Human Toxicol*, 1987; 6:279-291.
- Yoshida H, Hagihara Y, Ebashi S. *Toxicology and experimental models. Advances in pharmacology and therapeutics*. II. Gran Bretaña: Pergamon Press, 1979.
- Zbinden G, Gross F. *Phannacological methods in toxicology*. Gran Bretaña: Pergamon Press, 1979.