

## **Ensayos biológicos regulados por normativas OECD: características, criterios de elección y aspectos relevantes**

\*Castro-Murillo, M.<sup>1</sup>, González-Betancur, J.<sup>1</sup>, González-Camacho, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sección de Genética y Cultivo Celular del Laboratorio de Ensayos Biológicos, Universidad de Costa Rica –LEBI-UCR.

\*maripaz.castro@ucr.ac.cr. Teléfono: (506) 2511-3437 Fax: (506) 2511-8309

**Resumen:** La OECD regula una serie de ensayos biológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, los cuales son utilizados por muchos países alrededor del mundo y que son aplicados para distintos fines. En este manuscrito se presenta el resumen de todos los ensayos, organizados según diferentes parámetros, con el fin de que los investigadores encuentren de forma rápida, el ensayo que más se ajusta a sus necesidades de investigación. De esta manera, mediante cuadros comparativos y un árbol guía que toma en cuenta toda la lista de ensayos regulados por la OECD hasta la fecha, se espera facilitar la búsqueda de los investigadores respecto al mejor ensayo aplicable a sus necesidades.

**Palabras clave:** normativas OECD, modelos *in vitro*, modelos *in vivo*, toxicología

### **Biological assays regulated by OECD normative: characteristics, election criteria and important aspects**

**Abstract:** The OECD regulates a series of biological tests, both *in vivo* and *in vitro*, which are used by many countries around the world and which are applied for different purposes. In this manuscript we present the summary of all the trials, organized according to different parameters, in order that researchers find quickly, the trial that best fits their research needs. In this way, through comparative tables and a guide tree that takes into account the entire list of tests regulated by the OECD to date, it is hoped to facilitate the researchers' search for the best trial applicable to their needs.

**Key Words:** OECD normatives, *in vitro* models, *in vivo* models, toxicology

## **Introducción**

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, por sus siglas en inglés) es una organización que se encarga de dar guías y recomendaciones a los gobiernos de 33 países, los cuales siguen los lineamientos establecidos y actúan en armonía con las políticas de cada país. La premisa básica de la OECD es que los principios acordados internacionalmente, pueden ayudar a prevenir malentendidos y construir una atmósfera de confianza y previsibilidad entre los negocios, el trabajo, gobiernos y la sociedad en su conjunto (Gordon, 2001). Los países utilizan estos instrumentos como guía para entender sus responsabilidades, en el caso de los ensayos biológicos, las guías estipuladas por la OECD regulan la uniformidad de las pruebas y los análisis a nivel mundial. Esto garantiza la calidad y la efectividad de los resultados obtenidos (Liebsch y Spielmann, 2002).

Actualmente, dentro de la categoría de “Seguridad Química y Bioseguridad”, la OECD ha hecho diferentes divisiones temáticas, con el fin de garantizar la seguridad química y las buenas prácticas de laboratorio. De esta forma, se podrán garantizar resultados fiables y de alta calidad, para que los países y la industria puedan beneficiarse plenamente. Dentro de estas divisiones temáticas se encuentran: pruebas de productos químicos, asesoría en el manejo de productos químicos, prevención de accidentes químicos, liberación de contaminantes, seguridad de nanomateriales, pesticidas y biocidas usados en la agricultura, y bioseguridad (OECD, 2004). Dentro de las categorías mencionadas, se encuentran diferentes ensayos empleados para evaluar las sustancias deseadas. Algunos de estos involucran el uso de animales, sin embargo, algunos ensayos utilizados actualmente en el mundo, se realizan *in vitro*, es decir, no involucran el uso de animales.

Los ensayos *in vitro* han sido alternativa para evaluar diferentes sustancias, analizar citotoxicidad y estudiar el comportamiento celular ante diferentes estímulos externos, sin necesidad de utilizar animales, obedeciendo el principio de las 3R. En la ciencia de animales de laboratorio, el principio de las 3R de Russel y Burch, establecido en 1959 (Russell y Burch, 1959), se basa en el trato adecuado de los animales, de forma tal que los investigadores buscan alternativas que permitan reemplazar el uso de animales por otras metodologías de investigación, la reducción del número de animales utilizados y el refinamiento de las técnicas que involucran el uso de animales en experimentación, de forma que se reduzca al máximo el dolor y su distrés, durante la ejecución de los ensayos.

El reemplazo es el principio rector de los ensayos *in vitro* (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Spielmann *et ál.*, 2008). Aunque el material utilizado para los ensayos (células o tejidos), provenga de un animal, el número de organismos involucrados es mucho menor que si se usan animales completos en las investigaciones, lo cual también respondería al principio de la reducción del uso de animales, mencionado anteriormente. A pesar de esto, existen limitaciones en el uso de ensayos *in vitro*; los resultados extraídos de dichas pruebas, carecen de una perspectiva más completa sobre las funciones fisiológicas que afectarían la respuesta de un organismo completo. Es en los casos mencionados, donde se deben realizar ensayos *in vivo*, los cuales están debidamente reglamentados y siguen los principios básicos de ética sobre el uso de animales en experimentación (Festing y Wilkinson, 2016).

En la presente guía se analizarán los ensayos *in vitro* e *in vivo*, regulados bajo las normativas de la OECD. Se elaborará un resumen de las características principales de cada ensayo, con el fin de que los investigadores identifiquen cuál es la prueba que mejor se ajusta a sus necesidades de experimentación.

## **Ensayos bajo la normativa OECD**

El catálogo de guías para ensayos de sustancias químicas de la OECD consta, hasta el 2017, de sesenta y siete guías aprobadas y actualizadas (Cuadro 1 y 2). Cuarenta y cuatro de estas guías se desarrollan *in vivo*, veintidós *in vitro* y uno *in chemico*.

Las guías aprobadas incluyen procedimientos de prueba de toxicidad de las sustancias químicas en varios niveles, desde ensayos que prueban la irritación provocada por la sustancia hasta ensayos dirigidos a comprobar la actividad mutagénica. Asimismo, las guías disponibles incluyen procedimientos para la administración de sustancias por ingestión (vía oral en bebida o alimento), por inhalación o vía aérea en ensayos *in vitro*, por contacto cutáneo o directo y por inyección. Dada la gran variedad de clasificaciones posibles y las décadas que llevan algunas de las guías en circulación, la OECD tiene disponible una extensa lista de sustancias químicas examinadas y descritas con los diversos ensayos aprobados.

Para validar los resultados obtenidos con cualquiera de los ensayos, es necesario llevar a cabo una serie de pasos para demostrar la competitividad del laboratorio y ejecutar los ensayos de forma confiable. Los requisitos que deben cumplir a cabalidad los laboratorios, son muy similares entre ensayos de la misma índole, de forma que los resultados de los ensayos sean comparables y reproducibles, de forma tal que demostrar la reproducibilidad y la repetibilidad de los ensayos, es necesaria para considerar como válidos los resultados reportados.

## **Ensayos *in vivo* y sus condiciones experimentales**

Los ensayos *in vivo* suelen ser descritos específicamente para su implementación en ratas, ratones, conejos, conejillos de indias o gallinas; sin embargo, un gran porcentaje de estos

ensayos admite el uso de especies no convencionales, inclusive silvestres, con la debida justificación científica. A pesar de esto, siempre se aconseja la utilización de animales de uso típico de laboratorio por su disponibilidad, fácil manipulación y el extenso conocimiento disponible.

Cabe considerar, por un lado, que el número de los animales a utilizar en un ensayo, depende principalmente de la severidad esperada del efecto de la sustancia a prueba, de la sensibilidad del tejido, del número de concentraciones a suministrar y de la potencia estadística deseada por los investigadores. Por otra parte, el sexo de los individuos depende de si se han reportado diferencias intersexuales a la exposición ante la sustancia de interés, a sustancias de naturaleza química similar o en caso de los ensayos endocrinos, si los receptores son específicos de andrógenos o estrógenos.

Cada ensayo tiene sus particularidades, el tipo y número de animales, así como la edad de estos, depende de la finalidad de cada ensayo. En el cuadro 1, se encuentran listados los ensayos *in vivo* vigentes hasta la fecha así como el tipo de animal que se usa en cada uno. Los detalles de cada ensayo deben ser consultados pues incluyen diferencias importantes entre los procedimientos, que han sido consideradas para analizar cada sustancia que se quiere probar, según sea el caso.

### **Ensayos *in vitro* y sus condiciones experimentales**

Los ensayos *in vitro* vienen a reemplazar en la medida de lo posible, el uso de animales de experimentación, obedeciendo al principio de las 3R de Russel y Burch (Kandárová y Letašiová, 2011). La comunidad científica admite sin reservas la utilidad y los resultados obtenidos por diversos procedimientos *in vivo* e *in vitro* en la investigación; sin embargo, solo

una pequeña cantidad se encuentra aceptada por las entidades reguladoras para ser utilizada en la evaluación del riesgo y el registro de un nuevo compuesto, siendo necesario que el protocolo haya sido validado científicamente y a su vez, demostrado que es tan seguro y fiable como el método *in vivo* que pretende reemplazar (Meneau, 2014).

Los ensayos *in vitro* son poco flexibles en cuanto a la línea celular que debe ser utilizada, ya que corresponden a los tejidos de interés para el ensayo. Algunos de los ensayos *in vitro* son descritos para su desarrollo directo sobre órganos, como será detallado más adelante. Debe prestarse especial atención a las aclaraciones para cada ensayo sobre el peso de sus resultados porque, por ejemplo, la mayoría de los ensayos *in vitro* de toxicidad a nivel cutáneo se aconsejan como complemento o primeras fases de investigaciones, pues no reemplazan los ensayos *in vivo*. Lo mismo ocurre, con menor frecuencia, con ensayos sobre otros tejidos.

De igual modo, se presenta con los ensayos *in vivo*, cada ensayo *in vitro* tiene su línea celular o tejido específico, con el fin de evaluar la sustancia de interés, y que se pueden observar en el cuadro 2. Las particularidades de cada ensayo se describen en las correspondientes guías de la OECD, igual que ocurre con los ensayos *in vivo*.

### **Guía para la selección de ensayos**

Para facilitar la búsqueda y selección efectiva de ensayos aprobados por la OECD, se proporciona en la fig. 1, una guía sencilla que simplifica dicha búsqueda. En la fig. 1, se puede observar un amplio resumen de todos los ensayos, aprobados hasta el 2017, clasificados según los criterios clave que definen el tipo específico de ensayo a utilizar. Debe tenerse en cuenta que los ensayos de la OECD no consideran ensayos en todos los sistemas, órganos, tejidos diana o vías de exposición posibles.

Figura 1. Resumen de ensayos *in vivo* e *in vitro* regulados por normativas OECD, organizados según diferentes características.

Como se observa en la fig. 1, los ensayos se encuentran clasificados en **el primer nivel** por el sujeto experimental, si hay animales implicados son modelos *in vivo*, si el ensayo se realiza en líneas celulares o tejidos extracorpóreos de un animal son modelos *in vitro*. Asimismo, en la misma figura se observa la existencia de un ensayo *in chemico*. Los ensayos *in chemico* básicamente, consisten en evaluar la capacidad de que las sustancias reaccionen con moléculas orgánicas con actividad biológicas, lo cual puede ser un indicador de toxicidad (Pople, 1999). En el **segundo nivel** se observa una clasificación según el nivel de organización en el que se espera observar un efecto (sistemas, órganos, tejidos o células). Finalmente, **en el tercer** se puede observar la clasificación de los ensayos según la vía de exposición a la sustancia o el tipo de toxicidad a evaluar (mutagénesis o citotoxicidad, por ejemplo). El número identificador de cada ensayo perteneciente al mismo grupo de ensayos se encuentra en la parte inferior de la figura.

Cada uno de los ensayos tiene características muy específicas, así como detalles en los procedimientos, los cuales se deben consultar minuciosamente antes de iniciar con la evaluación. Hay que recordar que esta revisión pretende dar una información rápida de cuál ensayo implementar, pero no da detalles de cada ensayo, para esto, con el número de la guía OECD se pueden buscar en el enlace electrónico <http://www.oecd.org/>

## **Conclusiones**

Se brinda un resumen amplio de todos los ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro*, regulados por normativas OECD. De esta forma se espera que los investigadores ubiquen, según sus

necesidades, el ensayo que más les convenga, de forma rápida y así, consultar posteriormente, los detalles pertinentes.

## **Bibliografía**

1. Festing S, Wilkinson R. The Ethics of Animal Research. En Armstrong S, Botzler R. (Eds.), The Animal Ethics Reader. Taylor y Francis, Nueva York, Estados Unidos. 2016, p. 352-362.
2. Gordon K. The OECD Guidelines and Other Corporate Responsibility Instruments: A Comparison, OECD Working Papers on International Investment, 2001/05. 2001. OECD Publishing, Paris.
3. Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2008; 4(10), 1279-1294.
4. Kandárová H, Letašiová S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. Interdiscip Toxicol. 2011; 4(3), 107-113.
5. Liebsch M, Spielmann H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. Toxicology Letters. 2002; 127, 127-134.
6. Meneau R. Métodos Alternativos en Toxicología. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2014; 45(1), 18-28.
7. Organization for Economic Co-operation and Development- O.E.C.D. The OECD principles of corporate governance. Contaduría y Administración, 2004; 216, 183-194.
8. Pople JA. Nobel lecture: Quantum chemical models. Reviews of Modern Physics. 1999; 71(5), 1267.
9. Russell W, Burch R, Hume C. The principles of humane experimental technique. 1959. London, Inglaterra: Methuen & Co. Ltd., 2197



Cuadro 1. Listado de ensayos in vivo vigentes hasta la fecha y regulados por las normativas OECD.

<b>OECD no.</b>	<b>Nombre del ensayo y descripción</b>	<b>Animal</b>
402	Toxicidad dérmica	Ratas de 8-10 semanas
403	Toxicidad aguda por inhalación	Ratas de 8-12 semanas
404	Corrosión e irritación dérmica aguda	Conejos
405	Corrosión e irritabilidad aguda	Conejos
406	Sensibilización dérmica	Cobayos
407	Toxicidad oral sub-crónica	Ratas
409	Toxicidad oral en no roedores con repetición de dosis de 90 días	Cualquier mamífero excepto roedores
410	Toxicidad dérmica con repetición de dosis	Ratas, conejos o cobayos
411	Toxicidad sub-crónica dérmica	Cobayos
412	Toxicidad por inhalación	Ratas de 7-9 semanas
413	Toxicidad sub-crónica por inhalación	Ratas de 7-9 semanas
414	Toxicidad prenatal del desarrollo	Ratas o conejos
415	Toxicidad reproductiva	Ratas o ratones
416	Toxicidad en la reproducción	Ratas o ratones
417	Toxico-cinética	Ratas
418	Toxicidad oral con repetición de dosis de 90 días	Ratas
418	Neuro-toxicidad retrasada de organofosforados después de exposición aguda	<i>Gallus gallus domesticus</i>
419	Neuro-toxicidad retrasada de organofosforados con repetición en 28 días	<i>Gallus gallus domesticus</i>
420	Toxicidad oral aguda por dosis fija	Ratas
421	Toxicidad de reproducción y desarrollo	Ratas
422	Toxicidad de reproducción y desarrollo con dosis combinada repetida	Ratas
423	Toxicidad oral aguda	Ratas
424	Neurotoxicidad	Ratas
425	Toxicidad oral aguda con procedimiento <i>up and down</i>	Ratas

426	Neurotoxicidad del desarrollo	Ratas
427	Absorción dérmica	Ratas
429	Sensibilización dérmica por método LLNA con radio marcadores	Ratones de 8-12 semanas
433	Toxicidad aguda por inhalación	Ratas
436	Toxicidad aguda por inhalación	Ratas
440	Bioensayo útero-trófico	Ratas
441	Ensayo Hershberger para propiedades androgénicas y anti-androgénicas	Ratas
442 A	Sensibilización dérmica por método LLNA sin radio marcadores	Ratones de 8-12 semanas
442 B	Sensibilización dérmica por el método LLNA BrdU-ELISA sin radio marcadores	Ratones de 8-12 semanas
443	Toxicidad reproductiva	Ratas
451	Carcinogenicidad	Roedores
452	Toxicidad crónica oral, dérmica y por inhalación	Ratas o ratones
453	Carcinogenicidad y toxicidad crónica oral, dérmica o por inhalación	Roedores
474	Micro-núcleos de eritrocitos de mamíferos	Ratas, ratones o cualquier mamífero
475	Geno-toxicidad	Ratas o ratones de 6-10 semanas
478	Dosis letal en roedores (DL)	Ratones y ratas
483	Aberraciones en espermatogonios de mamíferos	Ratas o ratones de 8-12 semanas
485	Toxicología genética	Ratones
486	Células de hígado de mamífero	Ratas o ratones
488	Mutaciones en genes somáticos y germinales	Ratones
489	Ensayo cometa en mamíferos	Roedores de 6-10 semanas

Cuadro 2. Listado de ensayos *in vitro* vigentes hasta el 2017 y regulados por las normativas OECD

OECD no.	Nombre del ensayo y descripción	Células o tejido
428	Absorción por la piel	Piel humana o de roedor
430	Corrosión dérmica	Discos de piel de rata
431	Corrosión de la piel	Queratinocitos humanos no transformados
432	Foto-toxicidad	Células 3T3
435	Corrosión dérmica	Membrana de un gel acuoso proteico
437	Opacidad bovina y permeabilidad	Células de la córnea
438	Evaluación de sustancias que inducen daño ocular serio	Ojos de pollo extirpados <i>post mortem</i>
439	Irritación cutánea	Queratinocitos epidérmicos
442D	Sensibilización dérmica	Queratinocitos humanos estables transfectados inmortalizados
442E	Sensibilización dérmica <i>in vitro</i>	Células THP-1 de leucemia monocítica
455	Agonistas y antagonistas de receptores de estrógenos	ER $\alpha$ -HeLa-9903
456	Esteroidogénesis	Células NCI-H295R
458	Activación transcripcional de transfección estable de receptores humanos de andrógenos	Línea celular AR-EcoScreen
460	Corrosión e irritación ocular severa	Células MDCK CB997
471	Mutación reversa bacteriana	Bacterias <i>S. tiphimurium</i>
473	Aberraciones cromosómicas en mamíferos	Células CHO, V79, CHL/IU, TK6, linfocitos primarios
476	Citotoxicidad, estabilidad genética y mutaciones de genes en mamíferos, como p53	Células CHO, CHL, V79, L5178Y y TK6
487	Micro-núcleos de mamíferos	Células CHO, CHL, V79, L5178Y y TK6
490	Citotoxicidad, mutaciones en genes de mamíferos como el de la timidín-kinasa	Células L5178Y y TK6
491	Evaluación de daño severo al ojo	Células en monocapa de SIRC
492	Irritación o daño serio ocular	Keratinocitos humanos o células de córnea humana
493	Actividad del receptor de estrógenos	No aplica