

6. Evaluación de la posible toxicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

Introducción

La evaluación de riesgos también toma en consideración la estimación y evaluación del nivel y la frecuencia de la ingesta de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. De ese modo se tiene en cuenta con qué frecuencia y en qué medida estaría expuesta la población a sustancias expresadas recientemente como proteínas, metabolitos o compuestos endógenos cuyo nivel en los alimentos ha sido alterado debido al gen insertado (o a otros efectos no intencionales que se producen como consecuencia de la modificación genética).

Las pruebas toxicológicas convencionales que se han adaptado a partir de las elaboradas inicialmente para las sustancias químicas (es decir, aditivos alimentarios, plaguicidas y contaminantes de los alimentos) pueden constituir un enfoque adecuado para establecer la inocuidad de sustancias recientemente expresadas. Se puede establecer el NSEO (nivel sin efectos [adversos] observados) de la nueva sustancia y posteriormente el coeficiente de seguridad relativo al nivel de exposición previsto de la población en general. Por consiguiente, el coeficiente de seguridad se aplica para obtener una ingesta diaria admisible o tolerable. Si se van a emprender estos estudios, deberían proyectarse en función de la identidad y función biológica de las sustancias estudiadas.

Sin embargo, los estudios toxicológicos convencionales sobre la inocuidad de alimentos enteros no son significativos en la práctica porque los alimentos son mezclas complejas de compuestos que se caracterizan por una gran variación en su composición y valor nutritivo. Por lo tanto, puede resultar muy difícil detectar los posibles efectos adversos y relacionarlos de manera concluyente con una determinada característica del alimento. Las dificultades que presenta la aplicación de los enfoques toxicológicos tradicionales a las plantas de ADN recombinante han conducido a la elaboración del concepto de equivalencia sustancial. Este enfoque conceptual reconoce que el objetivo de la evaluación no es establecer la inocuidad absoluta, sino determinar si los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante son o no tan inocuos como sus homólogos convencionales.

Enfoque conceptual de los estudios de toxicidad

El enfoque conceptual para la evaluación de las posibles propiedades tóxicas de los alimentos requiere la caracterización bioquímica del nuevo producto obtenido a partir del elemento de ADN insertado mediante estudios de digestibilidad *in vitro*, la determinación de la similitud de la secuencia de aminoácidos con toxinas conocidas y estudios de toxicidad oral aguda basados en un modelo animal. Si de estos estudios se puede inferir que habrá un efecto a largo plazo, será necesario realizar pruebas complementarias de toxicidad crónica y subcrónica. Los estudios de digestibilidad *in vitro* se llevan a cabo para establecer la resistencia del nuevo producto a los ácidos, simulando con ello las condiciones de los fluidos gástricos e intestinales. La secuencia de los seis aminoácidos amino-terminales se compara con la secuencia amino-terminal de toxinas conocidas para determinar si son similares. Si son

PÁRRAFO 34 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* permiten la introducción de ADN que puede determinar la síntesis de nuevas sustancias en las plantas. Tales nuevas sustancias pueden ser componentes convencionales de los alimentos vegetales, como proteínas, grasas, carbohidratos o vitaminas que resultan nuevos en el contexto de la planta de ADN recombinante en cuestión, aunque también podrían incluir nuevos metabolitos que son producto de la actividad de enzimas generadas por la expresión del ADN introducido.

PÁRRAFO 35 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

La evaluación de la inocuidad debe tomar en cuenta la naturaleza química y la función de la nueva sustancia expresada e identificar la concentración de la misma en las partes comestibles de la planta de ADN recombinante, incluyendo las variaciones y los valores medianos. También, se deberá considerar la exposición corriente en la dieta y los posibles efectos en ciertos subgrupos de la población.

PÁRRAFO 36 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Deberá facilitarse la información que garantice que no se han transferido genes que forman parte de toxinas o antinutrientes conocidos, presentes en los organismos donantes, a plantas de ADN recombinante que normalmente no expresan tales características tóxicas o antinutritivas. Garantizar esto es especialmente importante en los casos en que una planta de ADN recombinante se elabora de manera diferente con respecto a la planta donante, ya que las técnicas convencionales de elaboración de alimentos asociadas a los organismos donantes pueden desactivar, degradar o eliminar los antinutrientes o las sustancias tóxicas.

PÁRRAFO 37 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Por los motivos enunciados en la Sección 3, puede que no se considere necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales cuando la sustancia en cuestión, u otra estrechamente relacionada con ella,

tomando en cuenta su función y exposición ha tenido un consumo inocuo en los alimentos. En otros casos puede ser necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales u otros estudios con la nueva sustancia.

PÁRRAFO 38 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

En el caso de las proteínas, la evaluación de la toxicidad potencial deberá concentrarse en la analogía entre las secuencias de aminoácidos de la proteína examinada y de toxinas y antinutrientes proteicos conocidos (por ej., inhibidores de la proteasa, lectinas) así como en la estabilidad térmica o durante la elaboración y la degradación en modelos apropiados y representativos de los sistemas gástricos e intestinal. Se podrán llevar a cabo estudios apropiados de la toxicidad oral¹⁵ en aquellos casos en que la proteína esté presente en el alimento, no sea similar a proteínas que han tenido un consumo inocuo en los alimentos o no haya tenido previamente un consumo alimentario inocuo, tomando en consideración su función biológica siempre que se conozca.

PÁRRAFO 39 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá evaluar caso por caso la toxicidad potencial de sustancias no proteicas que no han tenido un consumo inocuo en alimentos, tomando en consideración la identidad y la función biológica de la sustancia en la planta y la exposición dietética a la misma. Los tipos de estudios que han de realizarse pueden incluir estudios de metabolismo, toxicocinética, toxicidad subcrónica, toxicidad/carcinogénesis crónica, y toxicidad en la reproducción y el desarrollo, según el enfoque toxicológico tradicional.

PÁRRAFO 40 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Esto puede requerir el aislamiento de la nueva sustancia procedente de la planta de ADN recombinante o bien la síntesis o producción de la misma a partir de una fuente alternativa, en cuyo caso se deberá demostrar que el material es equivalente desde el punto de vista bioquímico, estructural y funcional al producido en la planta de ADN recombinante.

¹⁵ Se han elaborado Directrices para los estudios de la toxicidad oral en distintos foros internacionales, un ejemplo son las Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos.

similares en grado significativo, es posible que el nuevo producto obtenido a partir del gen insertado sea una toxina. El nuevo producto se somete entonces a estudios de toxicología subcrónica con el fin de establecer el coeficiente de seguridad para el consumo con relación a la exposición de la población en general.

En los párrafos 34 a 40 de las Directrices del Codex se describe el enfoque conceptual para la evaluación de la toxicidad de una sustancia introducida.

Métodos utilizados para establecer la ausencia de toxicidad

En los párrafos 34 a 40 de las Directrices del Codex se describen los métodos utilizados para establecer si la nueva sustancia obtenida a partir del gen insertado es o no una toxina y los requisitos necesarios para ello. En los estudios de toxicidad se necesitan grandes cantidades de proteínas purificadas expresadas por el transgén. La cantidad que se puede obtener del tejido de la planta no suele ser suficiente, por lo que normalmente se extraen proteínas de microorganismos GM (como *Escherichia coli*) para que expresen la proteína en grandes

PÁRRAFO 10 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

El uso de modelos animales para establecer los efectos finales toxicológicos es un elemento fundamental en la evaluación de riesgos de muchos compuestos, como por ejemplo los plaguicidas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la sustancia que debe someterse a prueba está bien caracterizada, tiene una pureza conocida, no posee un valor nutricional particular, y por lo general comporta una exposición baja de los seres humanos. Resulta, por tanto, relativamente sencillo administrar tales compuestos a animales, en dosis superiores en varios órdenes de magnitud a los niveles previstos de exposición de los seres humanos, con miras a determinar los posibles efectos nocivos importantes para las personas. De esta manera se podrán estimar, en la mayoría de los casos, los niveles de exposición en los que no se observan efectos adversos, y fijar límites máximos seguros mediante la aplicación de factores de seguridad apropiados.

PÁRRAFO 11 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Los estudios en animales no pueden aplicarse automáticamente a la comprobación de los riesgos asociados a alimentos enteros, que constituyen mezclas complejas de compuestos caracterizadas a menudo por grandes variaciones en su composición y valor nutricional. A causa de su masa y efecto de saciedad sólo es posible, generalmente, suministrarlos a los animales en múltiples bajos de las cantidades que podrían estar presentes en la dieta de los seres humanos. Además, un factor funda-

mental que se deberá tener en cuenta en la realización de estudios en animales sobre ciertos alimentos, es el valor y equilibrio nutricional de las dietas utilizadas, para evitar inducir efectos nocivos que no dependen directamente del propio material. Por consiguiente, detectar los posibles efectos nocivos y vincularlos de manera categórica con una característica individual del alimento puede ser sumamente difícil. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una completa evaluación de la inocuidad, podrían requerirse estudios en animales, diseñados adecuadamente, con alimentos completos. Otra consideración importante para establecer la necesidad de estudios en animales es si resulta apropiado someter a los animales de laboratorio a tales ensayos cuando es improbable que éstos proporcionen informaciones significativas.

PÁRRAFO 12 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

En vista de las dificultades para aplicar a alimentos enteros los procedimientos tradicionales de ensayo toxicológico y evaluación de riesgos, se hace necesario un enfoque más específico para evaluar la inocuidad de los alimentos derivados de plantas alimentarias, incluidas las de ADN recombinante. Para abordar este problema se ha elaborado un método multidisciplinario de evaluación de la inocuidad que toma en cuenta los cambios intencionales o no intencionales que pueden producirse en la planta o en los alimentos derivados de ésta aplicando el concepto de *equivalencia sustancial*.

cantidades. En estos casos, se debe demostrar la equivalencia bioquímica y funcional entre la versión obtenida mediante bacterias y la expresada por la planta.

Habitualmente, se llevan a cabo estudios de alimentación en animales para establecer la ausencia de toxicidad aguda y subcrónica. No obstante, dichos estudios tienen limitaciones reconocidas. Es importante comprender que, si bien los estudios de alimentación en animales cuidadosamente realizados que demuestran una ausencia de efecto en resultados fisiológicos seleccionados pueden ser útiles, no ofrecen garantías absolutas de inocuidad debido a las salvedades habituales que se deben tener en cuenta al extrapolar los resultados de animales a seres humanos. Se considera que los resultados constituyen una “confirmación” y una “garantía de inocuidad” y son un componente adicional de la evaluación general de la inocuidad cuando las circunstancias lo justifiquen.

En los párrafos 10 a 12 de las Directrices del Codex se examinan las ventajas y limitaciones de los estudios con animales que se deben tener en cuenta para establecer la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante:

Los estudios de alimentación que utilizan alimentos enteros en lugar de compuestos aislados pueden resultar adecuados cuando hay cambios significativos en la composición del alimento obtenido de plantas de ADN recombinante; véase el párrafo 53 de las Directrices del Codex.

Los aspectos éticos y la necesidad de estudios de alimentación en animales son cuestiones que se deben replantear continuamente con el fin de evitar cualquier sufrimiento innecesario a los animales. La Consulta

PÁRRAFO 53 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Algunos alimentos podrían requerir ensayos adicionales. Por ejemplo, quizás se justifique la realización de estudios de alimentación en animales, para alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, si se prevé un cambio en la biodisponibilidad de los nutrientes o si la composición no es comparable a la del alimento convencional. Por otra parte, los alimentos destinados a producir beneficios para la salud podrían requerir estudios específicos, ya sea nutricionales, toxicológicos o de otra índole. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una evaluación cabal de la inocuidad, se podrían pedir estudios en animales, adecuadamente diseñados, con el alimento entero.

Recuadro 6.1. Necesidad de estudios en animales (FAO/OMS, 2000)

Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para realizar una evaluación a fondo de la inocuidad, quizá sea necesario realizar ensayos en animales. Esto es particularmente cierto cuando se prevé que el alimento va a hacer una importante contribución alimentaria, si no hay historia alguna de consumo del nuevo producto génico o si la modificación afecta a varias rutas metabólicas.

Cuando el alimento genéticamente modificado se distingue de su homólogo tradicional por la presencia de uno o varios nuevos genes y sus productos, quizá sea posible aislarlos y estudiarlos como se hace en los ensayos convencionales de la toxicidad de aditivos alimentarios.

No obstante, es indispensable garantizar que el material ensayado sea equivalente desde los puntos de vista bioquímico y funcional al producido en el alimento genéticamente modificado. Esto permite aumentar la sensibilidad de las pruebas de toxicidad en comparación con el caso en el que los productos de los vegetales genéticamente modificados han sido administrados directamente, y evita algunos de los artefactos que pueden presentarse en las pruebas de toxicidad en alimentos enteros. Sin embargo, esta estrategia sólo puede aplicarse si el análisis detallado previo no revela cambios significativos distintos de los esperados. En caso contrario, puede ser necesario ensayar el alimento entero. Cuando se realizan pruebas en animales con el alimento entero, por lo general debe utilizarse éste tal y como lo consume el ser humano. El tipo de estudio en animales habría de ser examinado en cada caso. Además de investigar los efectos toxicológicos potenciales, también puede ser necesario recurrir a los estudios en animales si la modificación genética afecta directa o indirectamente al contenido o la biodisponibilidad de los nutrientes.

Cuando se considera necesario realizar estudios toxicológicos para evaluar la inocuidad del alimento consumido a largo plazo en la dieta, suele considerarse que el estudio subcrónico de 90 días de duración es el mínimo requerido para probar la inocuidad del consu-

mo repetido de un alimento en la dieta. Quizá esto haya de ir precedido por un estudio piloto de corta duración para garantizar que la dieta sea aceptable para la especie del ensayo y que los niveles de incorporación de la sustancia ensayada sean apropiados, por ejemplo, que la dieta de control que contiene el nivel equivalente de comparador no produce efectos derivados de los niveles normales de toxicantes naturales presentes en alimentos tradicionales que se consideran inocuos. La dosis más alta utilizada en cualquier estudio en animales debería ser la máxima que pueda conseguirse sin provocar desequilibrios nutricionales, mientras que la dosis más baja utilizada debe ser comparable a la ingesta humana prevista.

La necesidad de pruebas toxicológicas adicionales debe examinarse caso por caso teniendo en cuenta los resultados del estudio a 90 días y otros estudios. Por ejemplo, los cambios de tipo proliferativo en los tejidos durante el estudio a 90 días pueden indicar la necesidad de realizar un estudio de toxicidad a más largo plazo.

El valor de los ensayos toxicológicos convencionales en la evaluación de alimentos enteros, inclusive los alimentos genéticamente modificados, es limitado. Basándose en los niveles máximos del alimento entero que pueden incorporarse a las dietas experimentales, como se ha indicado previamente, puede calcularse un margen de seguridad basado en la ausencia o en la naturaleza de los efectos adversos y la exposición humana probable. Los diseños experimentales mejorados deben tener en cuenta la necesidad de dietas animales que sean adecuadas desde el punto de vista nutricional, con lo que se evitará parte de los ensayos indebidos de alimentos o productos.

Se ha sugerido que el uso de marcadores biológicos de los efectos precoces podría aumentar el valor de diagnóstico y la sensibilidad de los ensayos de toxicidad en los alimentos (Schilter *et al.*, 1996). No obstante, será necesario distinguir bien entre los efectos adaptativos y los efectos tóxicos cuando se aplique este criterio.

16 Consulta mixta
FAO/OMS de expertos
sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, Tema 6:
Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos. 29 de mayo–2 de junio de 2000.

Recuadro 6.2. Estudios toxicológicos de alimentos producidos por medios biotecnológicos (FAO/OMS, 2000)

Cuando un alimento producido por medios biotecnológicos se diferencia de un alimento convencional en unas pocas características bien definidas, éstas pueden centrar el proceso de evaluación de la inocuidad y establecer qué pruebas son necesarias. Desde el punto de vista toxicológico, la evaluación se centrará en estas pocas características bien definidas. Cabe la posibilidad de aislar y estudiar las diferencias en un gen nuevo o en unos pocos genes nuevos y sus productos de forma análoga a como se hace en las pruebas convencionales de toxicidad de los aditivos alimentarios. Las pruebas convencionales de toxicidad de estos nuevos genes y sus productos consisten normalmente en un estudio normalizado de la toxicidad subcrónica de 14 días de duración (OCDE, 1995: Directriz 407). Normalmente, la sustancia que se va a probar en un estudio normalizado de la toxicidad subcrónica de 14 días se suministra a ratas de laboratorio en dosis correspondientes a un gran margen de inocuidad. El NSEO representaría el nivel máximo que se puede incorporar a las dietas experimentales sin que se produzcan efectos

adversos, lo que se podría traducir en el coeficiente de seguridad para la exposición humana al producto. Los estudios en seres humanos deberían contribuir al proceso de evaluación, y se podrían llevar a cabo cuando los estudios *in vivo* en animales demuestran que no hay efectos no intencionales ni irreversibles¹⁶.

Se debería adoptar un enfoque por etapas en lo que respecta a estos estudios para descubrir la tolerancia hasta los niveles máximos de ingesta potencial. Su finalidad es disponer de estudios clínicos controlados de confirmación antes de afrontar las mayores complejidades de la liberación general. Es conveniente que los estudios en seres humanos se realicen lo antes posible, dentro de unos límites éticos, para seleccionar los estudios en animales y evitar que éstos sean amplios pero improcedentes. Las observaciones obtenidas de estudios en animales y seres humanos pueden demostrar que el alimento es inocuo para el uso al que está destinado o revelar indicios imprevistos que exijan una investigación más detallada para confirmar la inocuidad del alimento.

Recuadro 6.3. Aspectos técnicos de los estudios de toxicidad subcrónica (FDA, 2003)*

Los estudios de toxicidad subcrónica en roedores suelen durar entre 90 días (3 meses) y 12 meses. Normalmente se utilizan para ayudar a predecir las dosis adecuadas de la sustancia de prueba en futuros estudios de toxicidad crónica, con el fin de establecer los NSEO para puntos finales toxicológicos o para diseñar los futuros estudios de toxicidad a largo plazo en roedores y otras especies de manera que hagan especial hincapié en los órganos seleccionados como objetivo. No se pueden utilizar para determinar el potencial carcinogénico de una sustancia de prueba.

Es fundamental que todos los estudios de laboratorio no clínicos se lleven a cabo conforme a las directrices internacionalmente reconocidas¹⁹ y a la reglamentación sobre buenas prácticas de laboratorio (BPL)¹⁸. A continuación se examinan otros factores que se deben tener en cuenta.

Animales de laboratorio

El cuidado, mantenimiento y estabulación de los animales de laboratorio se debe realizar siguiendo las directrices del documento *Guide for the care and use of laboratory animals*¹⁹.

Al seleccionar la especie, la cepa y el sexo se debe tener en cuenta la sensibilidad general de los animales de laboratorio. Hay que tomar en consideración la sensibilidad de determinados órganos y tejidos de los animales de laboratorio a la sustancia tóxica que se va a someter a prueba cuando se selecciona la especie, la cepa y la subcepa de los roedores para estudios de toxicidad. La selección de cepas endogámicas, exogámicas o híbridas de roedores para los estudios de toxicidad se deberá basar en las preguntas científicas a las que hay que responder. Por otra parte, los animales de laboratorio deberán proceder de colonias sanas y bien caracterizadas, dado que una información reciente ha señalado problemas de supervivencia en algunas cepas de ratas, y los animales de laboratorio se deberán seleccionar de forma que el estudio tenga la duración recomendada.

La edad de los animales de laboratorio puede influir en los resultados. Las pruebas se deberán realizar con animales jóvenes y el suministro de la dosis deberá comenzar inmediatamente después del destete, tras un período de aclimatación de al menos 5 días, y en el caso de los roedores no más tarde de las 6 u 8 semanas de edad.

En el estudio se deberá utilizar un número igual de machos y hembras de cada especie y cepa. En los estudios de toxicidad subcrónica, los grupos experimental y de control deberán constar, como mínimo, de 20 roedores de cada sexo por grupo. Estas recomendaciones ayudarán a garantizar que sobreviva hasta el final del estudio un número de animales suficiente para que la evaluación de los efectos toxicológicos sea significativa.

Se deberá estabular a un animal en cada jaula para evitar los siguientes problemas.

Si hay más de un animal en una jaula, no se puede establecer con exactitud la eficiencia de la alimentación (la relación entre el alimento consumido y el peso corporal adquirido).

Es imposible determinar si una disminución del peso corporal se debe a una menor apetecibilidad o a la toxicidad mediada por la sustancia.

Si no se enjaulan individualmente, se pueden perder órganos y tejidos de animales moribundos y muertos como consecuencia del canibalismo.

La dieta suministrada a los animales debe ser isocalórica y contener los mismos niveles de nutrientes (por ejemplo, fibra y micronutrientes) tanto en el grupo tratado como en el de control²⁰. Si las variables de la dieta no se controlan adecuadamente, puede haber un desequilibrio nutricional o una carencia calórica que podrían complicar la interpretación de los resultados del estudio de toxicidad y alterar las conclusiones y la reproducibilidad de los estudios.

Se deberá asignar cada animal al grupo de control o al tratado con el compuesto de forma aleatoria y estratificada, con el fin de reducir al mínimo el sesgo y garantizar la comparabilidad de las variables pertinentes en el grupo tratado y el de control (por ejemplo, la media y los intervalos de peso corporal). Si se van a utilizar otras características para la distribución aleatoria, se deberá describir y justificar esa caracterización. Se deberá reunir a los animales de todos los grupos para el estudio el mismo día; si esto no es posible debido al gran número de animales con que cuenta un estudio, se pueden ir reuniendo a lo largo de algunos días. Si se elige hacerlo a lo largo de varios días, se deberá analizar cada día una parte preseleccionada de los animales de control y de experimentación para que se mantenga la coincidencia.

Diseño del experimento

Los animales deberán estar expuestos a la sustancia de prueba 7 días a la semana durante un mínimo de 90 días consecutivos (3 meses).

La vía de administración de la sustancia de prueba deberá ser la indicada para la exposición humana normal. Si se utilizan vías alternativas, se debe ofrecer una justificación. Las posibles vías de administración se describen más abajo.

La sustancia se deberá suministrar en la dieta si se prevé que la exposición humana se produzca a través del consumo de alimentos sólidos o de una combinación de alimentos sólidos y líquidos. No se deberá permitir que los animales consuman de forma selectiva la dieta básica o la sustancia de prueba en la dieta. Hay que tener cuidado para garantizar que los procesos que se utilizan para granular el alimento, como el calentamiento, no afectan a la sustancia de prueba.

Se puede administrar la sustancia de prueba disolviéndola en agua para beber o bien mediante encapsulación o intubación oral (sonda) si se prevé que la exposición humana se produzca mediante la ingesta diaria de una única gran dosis y no mediante la ingesta continua de pequeñas dosis. La administración con sonda se deberá llevar a cabo aproximadamente a la misma hora todos los días, y el volumen máximo de solución que se administre por esta vía en una dosis dependerá del tamaño del animal de laboratorio. En el caso de los roedores, el volumen no deberá sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal y cuando se trate de sustancias grasas no deberá sobrepasar los 0,4 ml/100g de peso corporal. Si se divide la cantidad suministrada en dosis más pequeñas, se deberán administrar todas ellas en un período de 6 horas.

(Continúa)

¹⁷ OECD Guideline for the testing of chemicals, repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, 407, septiembre de 1998.

¹⁸ OECD Principles of Good Laboratory Practice, Directiva 87/18/CEE, Directiva 88/320/CEE

¹⁹ National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, National Academy Press.

²⁰ Nutrient requirements of laboratory animals, 4th Revised Edition, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, 1995.

Recuadro 6.3 (cont.)

Grupos de dosis

Se deberán utilizar al menos tres niveles de dosis de la sustancia de prueba por sexo (un nivel de dosis por grupo); no obstante, lo ideal sería utilizar cuatro o cinco niveles de dosis de la sustancia de prueba. Se deberá incluir un grupo de control coincidente. Los niveles adecuados de dosis para los estudios de toxicidad subcrónica se pueden establecer sobre la base de la información obtenida en estudios de toxicidad aguda a corto plazo.

Selección de dosis de tratamiento

En los estudios de toxicidad se deberán utilizar como mínimo tres niveles de dosis de la sustancia de prueba y un grupo de control coincidente. Los tres niveles de dosis administrados deberán atenerse a las siguientes directrices:

- la dosis alta deberá ser lo suficientemente elevada para inducir una respuesta a la sustancia tóxica en los animales de laboratorio;
- la dosis intermedia deberá ser lo suficientemente elevada para causar efectos tóxicos mínimos en los animales de laboratorio, como alteraciones en los niveles enzimáticos o un pequeño descenso en el aumento de peso corporal;
- la dosis baja no deberá inducir una respuesta a la sustancia tóxica en los animales de laboratorio.

Controles

Es necesario que haya un grupo de control coincidente de animales de laboratorio. En los estudios de alimentación se deberá suministrar a este grupo de control la dieta básica.

Se deberá suministrar a los animales del grupo de control una cantidad igual al volumen máximo del portador o vehículo de la sustancia de prueba suministrado a los otros grupos. Se deberá disponer de información sobre la toxicidad del portador o vehículo para garantizar que no se ponen en peligro los resultados del estudio.

Observación y pruebas clínicas: observación de los animales de laboratorio

Durante el tiempo que dure el estudio se deberán observar los signos generales de efectos farmacológicos y toxicológicos, morbilidad y mortalidad en todos los animales al menos una o dos veces al día. El intervalo normal entre observaciones deberá ser de al menos 6 horas.

Se deberán llevar registros individuales de cada animal y documentar el momento de inicio, las características y el progreso de todos los efectos observados, a ser posible utilizando un sistema de puntuación. Las evaluaciones clínicas no deberán valorar únicamente los efectos farmacológicos y toxicológicos generales, sino también trastornos neurológicos, cambios en el comportamiento, disfunción autonómica y otros signos de toxicidad que afecten al sistema nervioso. Entre los signos observados se deberán incluir, sin limitarse a ello, cambios en la piel, el pelo, los ojos y las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y otras pruebas de actividad autonómica. Además, se deberán registrar cambios en la postura y la respuesta al manejo, así como la aparición de accesos tónicos o clónicos, movimientos estereotípicos o comportamiento extraño. Se deberá registrar el desarrollo de tumores, sobre todo en los estudios a largo plazo. En el curso de un estudio los indicios farmacológicos o de toxicidad pueden sugerir la necesidad de realizar pruebas clínicas adicionales o de ampliar los exámenes post mortem.

Datos sobre peso corporal e ingesta alimentaria

Los animales de laboratorio se deberán pesar al menos una vez a la semana. El consumo de alimentos (o de agua, si la sustancia de prueba se administra en el agua para beber) se deberá medir todas las semanas durante un estudio de toxicidad subcrónica.

Pruebas clínicas

Se deberán realizar las siguientes pruebas: examen oftalmológico, perfiles hematológicos, pruebas clínicas químicas, análisis de orina, reconocimiento y pruebas de neurotoxicidad y estudios inmunotoxicológicos.

Exámenes necrópsico y microscópico

Todos los animales de laboratorio deberían ser sometidos a los siguientes exámenes: necropsia completa, medición del peso de los órganos, preparación de tejidos para un examen microscópico, evaluación microscópica e histopatología de los órganos linfáticos.

***Referencia:** US FDA. 2003. Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red Book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.

mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos de 2000 (*Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente*, Sección 4.2, párrafo 4.2.2) ofreció un provechoso debate sobre la necesidad de estudios en animales (Recuadro 6.1).

Habitualmente se considera que el mínimo requerido para probar la inocuidad del consumo repetido de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante en la dieta es un estudio de 90 días de duración sobre la toxicidad subcrónica en roedores. La Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos de 2000 (*Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos*, página 4) ofreció un provechoso debate sobre los estudios de toxicidad subcrónica (resumido en el Recuadro 6.2).

El documento elaborado por el Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos de los Estados Unidos sobre los principios toxicológicos de la evaluación de la inocuidad de los ingredientes alimentarios (US FDA, 2003) también puede ser una referencia útil en lo concerniente a los aspectos técnicos de los estudios de toxicidad subcrónica (resumido en el Recuadro 6.3.).

Estudios de toxicidad crónica


En los estudios de toxicidad crónica es necesario administrar a largo plazo la sustancia de prueba, normalmente en la dieta o el agua y, en ocasiones, mediante una sonda. Estos estudios se proyectan para detectar, en el órgano u órganos seleccionados, los posibles efectos acumulativos que dependen de la relación dosis-respuesta. Se deberá determinar caso por caso la necesidad de realizar estudios de toxicidad crónica a largo plazo, y únicamente si los resultados de los estudios de 90 días u otros estudios sobre alimentación indican que hace falta considerar la toxicidad desde una perspectiva a más largo plazo.

Garantía de calidad

Es muy importante que el proceso de organización y las condiciones en que se planifican, realizan, vigilan y registran los estudios de laboratorio, así como las condiciones en que se elaboran sus informes, sean conformes con los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Se deben aplicar los principios de las BPL a las pruebas que se realizan a las sustancias químicas con el fin de obtener datos sobre sus propiedades y su inocuidad para la salud humana o el medio ambiente. En los estudios toxicológicos es fundamental cerciorarse de que los datos utilizados para estimar la inocuidad son de una calidad aceptable para todas las partes. También es importante establecer la relación entre los cambios en los parámetros fisiológicos medidos y las dosis del compuesto sometido a prueba a que están expuestos los animales. Por lo tanto, es fundamental que los datos sean de buena calidad y propicien una interpretación exacta de la toxicidad y la estimación del NSEO del compuesto sometido a prueba. Basándose en esa interpretación, se puede establecer el coeficiente de seguridad estimando los niveles máximos a que puede estar expuesta la población humana sin que se observen efectos adversos para la salud. Por otra parte, cualquier diferencia que se observe en los parámetros fisiológicos medidos entre los animales tratados y no tratados debe ser sometida a un análisis estadístico para establecer los límites de confianza de dichas diferencias.

Referencias

- Doerfler, W. 2000. *Foreign DANN in mammalian systems*. Wennheim, Germany, Wiley-VCH. 181 pp.
- FAO/OMS. 2000. *Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente*. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, 29 de mayo–2 de junio de 2000, Ginebra, Suiza. http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_es.asp
- FAO/OMS. 2000. *Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos*. Tema 6. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, 29 de mayo–2 de junio de 2000, Ginebra, Suiza. <ftp://ftp.fao.org/esn/food/Bio-08.pdf>
- OCDE. 1995. *Guideline for the testing of chemicals, Guideline 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. <http://www.oecd.org/dataoecd/50/18/37478478.pdf>

- 
- OCDE. 1998. *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring number 1*. ENV/MC/CHEM(98)17. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. [http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem\(98\)17](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem(98)17)
- OCDE. 2000. *Report of the task force for the safety of novel foods and feeds*. C(2000)86/ADD1. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. [http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/C\(2000\)86-ADD1](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/C(2000)86-ADD1)
- Schilter, B., Holzhäuser, D., Cavin, C. y Huggett, A.C. 1996. An integrated *in vivo* and *in vitro* strategy to improve food safety evaluation. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 327–332.
- US FDA. 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents*. Washington DC, USA, United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.
- US National Research Council. 1995. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4th Revised Edition. Washington DC, USA, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture ●