TEMAS DE DIVULGACION

UTILIZACION DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO EN LA VALORACION DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES.

*M.C. Riva * y D. López***

0.1. Resumen

Este artículo pretende dar una visión general sobre el tema y las técnicas de toxicidad in vitro con cultivos celulares, las consideraciones básicas, las ventajas y limitaciones, y destacar las posibilidades que ofrecen este tipo de ensayos en la valoración del posible efecto nocivo de los productos químicos de uso humano o industrial en el medio ambiente.

Palabras clave: *Citotoxicidad in vitro, cultivos celulares, efectos ambientales.*

0.2. Summary. *USE OF IN VITRO CYTOTOXICITY ASSAYS IN THE EFFECT VALUATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS.*

This article try to give a general review about in vitro cytotoxicity assays with cultured cells; basic considerations, advantages and limitations, and the possibilities they offer in the effect valuation of chemicals (of human or industrial use) in the environment are presented in this paper.

Key words: *In vitro, cytotoxicity assays, cultured cells, environmental risks.*

0.3. Résumé. *USAGE DES ESSAIS DE CITOTOXICITE A L'EVALUATION DES EFFETS DES POLLUANTS SUR L'ENVIRONNEMENT.*

On pretend donner une vision générale sur les techniques de toxicité in vitro avec cultures cellulaires, les considérations basiques, les avantages et limitations, et détacher les possibilites dans l'évaluation de l'effet des produits chimiques d'usage humain et industriel, dans l'environnement.

Mots clef: *Citotoxicité, In vitro, cultures cellulaires, effects à l'environnement.*

1. INTRODUCCION

Numerosos contaminantes químicos de origen antropogénico se introducen en los medios acuáticos continentales, estuarios y aguas marinas y suponen un peligro potencial para los hábitats indígenas, así como una alteración del equilibrio de los ecosistemas acuáticos.

A pesar de que muchos de los compuestos químicos son estables, muchos otros son susceptibles de sufrir transformaciones biológicas y no biológicas dando lugar a una gran variedad de derivados. Tanto los compuestos químicos como sus derivados pueden acumularse en el agua y sedimentos alcanzando niveles tóxicos. En la determinación de su toxicidad existe una necesidad imperiosa de utilizar ensayos relativamente simples y rápidos para estimar el riesgo de compuestos específicos, papel que juega la toxicidad celular.

La toxicología celular puede considerarse como el conjunto de investigaciones cualitativas y cuantitativas, sobre los efectos nocivos o respuestas biológicas no deseadas, que experimenta un cultivo celular expuesto a un determinado compuesto químico, a fin de poder extrapolar los resultados a nivel de organismo. Este tipo de pruebas pueden también ser utilizadas como alternativa al uso de animales en ensayos toxicológicos. A pesar de que las pruebas in vivo no podrán ser substituidas por completo, ésta es una rama de la ciencia que avanza, minimizando en la medida de lo posible la utilización de organismos en los bioensayos.

Los numerosos estudios de este campo, han permitido que hoy en día se pueda viabilizar el cultivo de una gran variedad de líneas celulares de diferentes órganos y especies, sobre los que realizar cualquier tipo de estudio de carácter biológico, bioquímico o molecular.

Algunas veces ha sido posible demostrar el riesgo de un determinado producto químico para el hombre, pero sólo de una manera asociativa causa-efecto, sin poder entender sus motivos con el empleo de pruebas con animales. A menudo estas carencias pueden ser suplidas con la utilización de pruebas in vitro que permiten una comprensión más profunda de las causas.

* Dra. en Ciencias Biológicas, Mª Carmen Riva Juan. Investigadora de la Universidad Politécnica de Catalunya. Jefa del Laboratorio de Toxicología Ambiental del INTEXTER (UPC).

** Licenciado en Ciencias Biológicas (Bioquímica), David López Ribas. Estudiante de Doctorado. Laboratorio de Toxicología Ambiental del INTEXTER (U.P.C.).

2. CONCEPTOS GENERALES

2.1. Ventajas de la utilización de cultivos celulares

A pesar de que los estudios con cultivos celulares datan de hace varias décadas, quizás ha sido en los últimos años cuando su utilización en el campo de la toxicidad se ha visto aumentada frente a gran parte de los bioensayos comunes. La ferviente preocupación de la sociedad por todo lo concerniente a la naturaleza y ecología ha desencadenado el que los científicos se enfrenten a una gran presión social por la utilización de animales en los laboratorios.

Pero como toda técnica nueva que se establece ha de presentar una serie de ventajas frente a la anterior:

- Métodos alternativos a la utilización de animales, substitución parcial de bioensayos.
- Creación de pruebas rápidas y directas para evaluar la toxicidad de productos de nueva formación (síntesis o transformación).
- Disminución de costos.
- Reducción de la presión social.
- Una mayor sensibilidad debido a su carácter citológico.
- Posibilidad de detección de efectos a largo plazo.
- Algunas reacciones sistemáticas pueden ser simuladas in vitro, como procesos inflamatorios, desórdenes teratogénicos o disminuciones neurofisiológicas.

Dentro de este apartado se podría considerar como factor favorable al uso de este tipo de técnicas los problemas que supone la utilización de animales[1].

- Costo del mantenimiento de los animales.
- Regulaciones legales que incrementan el costo del animal.
- Dificultad de aislamiento y separación de metabolitos puros y metabolizados de fluidos biológicos complejos.
- Las cantidades de metabolitos aisladas in vitro pueden ser demasiado pequeñas que no permitan los análisis físico-químicos o bioquímicos.

2.2. Limitaciones de la metodología in vitro

El estudio in vitro presenta una serie de limitaciones que han de ser tenidas en cuenta en el momento de extrapolar su resultado, por lo que es importante que alguna medición sea comparada un vivo; es decir:

- En los cultivos no están presentes las interacciones con otros tejidos del organismo como la influencia hormonal u otros moduladores de la actividad celular.
- No se consideran la penetración en el tejido, la eliminación y la excreción de la toxina.
- Muchas sustancias no son tóxicas originalmente sino a través de derivados surgidos por su metabolización en el hígado, y algunas sustancias tóxicas in vitro pueden ser detoxificadas por enzimas hepático [2].

2.3. Obtención de células originales

Podemos considerar como células originales aquellas a partir de las cuales se desarrolla el cultivo primario, del cual se crea una batería de cultivos derivados, sobre los que realizar las pruebas y ensayos necesarios. Existen dos sistemas básicos para la obtención de las células originales:

- Petición a un banco de células (ej. ATCC American Tipe Culture Collection).
- Obtención a partir de un tejido de un organismo vivo.

Este segundo apartado merece una mayor atención ya que ha sido aquí donde se han alcanzado grandes logros. En el tejido las células están unidas mediante interacciones entre proteinas como colágeno y elastina; glicoproteinas como la fibronectina; mucosacáridos y lípidos. Si bien los cultivos celulares primarios se inician a partir de explantes, es utilizada en la mayoría de los casos una suspensión de células individuales, obtenidas con el uso de enzimas proteolíticos (tripsina, colagenasa, papaina) en soluciones diluidas. Según el tipo de tejido, sobre todo si son en individuos adultos (hígado, vasos sanguíneos) puede ser necesario utilizar técnicas de perfusión, y para otros tejidos y para tejido embrionario, con conexiones intercelulares menos desarrolladas, es suficiente con incubación de una porción del tejido en presencia de un enzima proteolítico o mezcla de enzimas. Cuando la digestión es completa los fragmentos son disgregados mediante aspiración repetida con pipeta Pasteur o cánula. A menudo la suspensión celular resultante es filtrada a través de una malla de nylon. En el medio encontraremos diferentes tipos celulares, por lo que para obtener la línea celular que nos interesa es necesario utilizar técnicas tales como un ambiente selectivo de crecimiento, un sustrato selectivo o un veneno selectivo al cual solo sea resistente la célula requerida[3]. En determinados casos puede ser necesaria la utilización de técnicas de centrifugación.

Walum[3] indica que es esencial que las células obtenidas sean caracterizadas antes de su utilización debiéndose cumplir las siguientes premisas:

- Las características morfológicas y de crecimiento de las células en cultivo deben ser reflejo de las observadas in vivo.
- Las propiedades generales bioquímicas deben mantenerse.
- Las propiedades funcionales especiales de cada tipo celular deben poder ser identificadas (Tabla 1).

Tabla 1
Ejemplos de relación entre propiedades funcionales y tipo celular según (E. Walum et al 1990)[3]

Tipo de célula	Característica
hepatocitos	actividad P 450
	pr. de albúmina
	gluconeogénesis
nefronas	
tubo proximal	microvellosidades prominentes
	actividad fosfatasa alcalina
tubo distal	microvellosidades cortas
músculo cardíaco	contracciones espontáneas
	receptores B-adrenérgicos
músculo esquelético	receptores nicotínicos de la acetilcolina
células endoteliales	actividad fosfatasa alcalina
linfocitos	inmunoglobulina

Una vez establecido el cultivo se ha de tener en cuenta que las líneas celulares no son completamente estables geneticamente por lo que hay que conservar un stock. Las células pueden ser congeladas en presencia de anticongelantes naturales como el glicerol o dimetilsulfóxido a un 5-10%, para evitar la formación de cristales que puedan afectar algunas estructuras. Se crean alícuotas de 2-6x10^6 células/ml, reduciéndose la temperatura lentamente hasta aprox. -90°C y transfiriéndose a un recipiente de nitrógeno líquido o a un congelador de bajas temperaturas.

2.4. Medios de cultivo

Coincidiendo con la diversidad de tipos y estirpes celulares que pueden ser cultivadas existe también una gran variedad de medios, pero la mayoría de veces la diferencia estriba básicamente en un complemento, o como en el caso de células de peces marinos en una solución salina para favorecer la correcta osmolaridad y evitar desórdenes iónicos. En su mayor parte están compuestos por agua bidestilada en un 70-80%, una fuente de carbono, aminoácidos, algún antibiótico de protección como estreptomicina o bencilpenicilina, ya que al ser medios ricos en nutrientes son susceptibles de sufrir contaminación por hongos o bacterias, y un tampón salino que generalmente es PBS (tampón fosfato). A partir de esta base pueden hacerse las variaciones necesarias para adaptarlo a la estirpe celular en cultivo. Los medios más utilizados son comunes y no presentan grandes variaciones entre células de peces y de mamíferos[4], entre ellos cabe citar los siguientes:

- Dulbecco´s Modified Eagle
- Eagle´s Minimun Essetial Medium
- Leibovitz´s L-15 Medium

Estos medios tienen una composición química definida y una biológica variable debido a que necesitan la presencia de 10-15% de suero fetal bovino como complemento nutritivo esencial. Además y dependiendo del tipo celular es necesaria la presencia de otros complementos como: DMSO, ácido oxalacético, mercaptoetanol, Hepes, triptosa fosfato, etc.. En muchos casos la elección de medios es obvia o recomendada por la fuente de obtención de las células originales, pero en algunos casos es una elección puramente empírica y experimental.

2.5. Líneas celulares

Cualquier tejido o célula no puede ser mantenida en condiciones in vitro debido a características fisiológicas restrictivas. Se ha podido comprobar experimentalmente que existe una relación inversa entre el grado de especialización de la célula y la viabilidad que presenta el cultivo, así por ejemplo es mucho más factible el uso de células poco específicas como las embrionarias o tumorales que células con un alto grado de diferenciación como las nerviosas o renales. El empleo de células tumorales es útil en numerosas pruebas in vitro debido a su facilidad de desarrollar un cultivo, ya que han perdido la capacidad de control sobre el crecimiento, pero por contra se han de tener en cuenta consideraciones especiales como el hecho de que su condición de transformadas puede afectar el nivel de respuesta respecto a una célula normal. A continuación se citan algunas de las células más utilizadas en ensayos de citotoxicidad:

- Células de mamíferos:

3T3-L1	células embriogénicas de ratón
BCL-D1	células embriogénicas humanas
LS-929	fibroblastos de ratónLLC-RKI
LLC-RK1	células renales de rata

- Células de peces:

RTG-2	fibroblastos de trucha "rainbow" (arcoiris)
FHM	células epiteliales de "fathead minnow"
BF-2	fibroblastos de agallas de "sun fish
BB	fibroblastos de agallas pez gato

2.6. Condiciones de cultivo

pH: La mayoría de células crecen a pH fisiológico pero a veces el óptimo puede ser diferente, en cualquier caso es necesaria la presencia de un tampón salino, generalmente bicarbonato sódico (pKa:6.1). También puede ser necesaria la creación

de la atmósfera enriquecida en CO2, con cabinas de flujo cerrado:

$$H_2O + CO_2 \text{ —— } H_2CO_3 \text{ —— } H^+ + HCO^-_3$$

Osmoralidad: La presión osmótica del plasma sanguíneo oscila alrededor de 290-310 mosm/kg dependiendo de las especies. En consecuencia el medio de cultivo ha de presentar una concentración total que esté dentro del rango fisiológico.

Temperatura: La temperatura óptima de crecimiento varía, como es de esperar, en función del tipo de especie y estirpe celular. Las células de mamíferos son estenotérmicas frente a las de peces que son euritérmicas; en el primer caso las temperaturas oscilan entre 34 y 37°C y en el segundo entre 20 y 25°C. Independientemente de usar la temperatura como factor condicional del crecimiento, se puede utilizar como una variable para valorar el diferente grado de respuesta.

2.7. Ensayos utilizados en pruebas de citotoxicidad

A lo largo de los años se han ido creando una gran variedad de pruebas y criterios para evaluar los efectos que presenta un cultivo después de su exposición a un determinado compuesto químico:

Pruebas citológicas: observación al microscopio

- Análisis de la estructura celular, efectos sobre el tamaño y la forma.
- Cambios en la estructura del cultivo.
- Lisis celular
- Efectos sobre el citoesqueleto.
- Pérdida de agregación al sustrato.
- Lesiones nucleares.
- Cambios en la estructura y propiedades de la membrana citoplasmática.
- Disminución del número de colonias.

Pruebas bioquímicas

- Efectos sobre el metabolismo:
  - -glucolisis
  - -inhibición de laa cadena respiratoria, etc
- Transporte de membrana
- Alteración en la producción proteica
- Efectos sobre la proliferación celular

A continuación se presentan unos ejemplos de relación entre técnicas utilizadas y parámetros estudiados:

Técnica	Parámetro
Lowry, Brakford	Proteína
Liberación CO_2	Metabolismo
Incorporación:	
Timidina H_3	Síntesis DNA
Uridina H_3	Síntesis RNA
LeucinaH_3	Síntesis proteína

Pruebas de viabilidad

Los ensayos de viabilidad pueden dividirse en dos grandes grupos [2]:

-de respuesta inmediata o de corto plazo
-de respuesta a largo plazo o de supervivencia

Pruebas a corto plazo

1.- Exclusión de colorante: Las células viables son impermeables a colorantes como nigrosina, azul tripan y a varios colorantes más. Según Kaltenbach et al. 1958[5] las células afectadas incorporan el colorante añadido al medio, calculándose la viabilidad por el porcentaje de células no teñidas.

2.- Incorporación de colorante: Las células viables incorporan diacetilfluoresceina y la metabolizan a fluoresceína en la membrana citoplasmática[6] y sólo las células vivas emiten fluorescencia verde.

3.- Ensayo del azul Kenacid: un compuesto químico puede influir en los procesos celulares de división, dando como resultado una disminución de la velocidad de crecimiento, así el azul de la preparación indica el contenido en proteínas[7].

4.- Ensayo del rojo neutro: Mide la incorporación de rojo neutro en lisosomas-endosomas de las células viables.

5.- Ensayo MTT: La viabilidad celular se mide por la aparición de un compuesto coloreado en mitocondrias a través de la reducción del MTT[8].

6.- Test del Colágeno: El efecto de un producto sobre un cultivo se valora midiendo la disminución de la red de colágeno celular[9].

Estudios a largo plazo

Los ensayos a largo plazo son usados para valorar la capacidad proliferativa de un cultivo después de haber sido expuesto a una toxina. El objetivo es medir la supervivencia de las células. La duración aproximada de este tipo de ensayo es de una a tres semanas.

1.- Plating efficiency: Se somete el cultivo a una exposición de 24 horas, posteriormente se incorpora tripsina y se observa la densidad celular y se incuba por un periodo de tres semanas contabilizándose las colonias[2].

2.- Micotritación: Exposición e incubación durante un periodo similar al anterior midiendo la viabilidad por la incorporación de (35S)-metionina[2].

3. APLICACIONES

Desde los últimos diez o quince años se ha producido un incremento en la aceptación del uso de cultivos celulares en pruebas de toxicidad, sobre todo en el campo de la industria farmacéutica, donde es importante demostrar la inocuidad de un producto de nueva formación o en su defecto tener un profundo conocimiento de los posibles efectos secundarios que pueda desarrollar.

Existen diferentes proyectos internacionales para el desarrollo y el estudio de las técnicas in vitro, como el caso de la Scandinavian Society for Cell Toxicology quien creó a finales de la década de los ochenta el programa MEIC (Multicenter Evaluation of In Vitro Citotoxicology), con la intención de profundizar tanto en el terreno teórico como experimental de estas técnicas, y valorar una amplia variedad de productos nuevos y ya existentes. Otro importante foco es el ERGATT-FRAME (European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing), el cual ha desarrollado más de cincuenta protocolos para el estudio y valoración de citotoxinas. El uso de los ensayos in vitro permite una visión diferente de la toxicidad sugiriendo cuestiones nuevas sobre el efecto de un agente (MEIC 1989) tales como:

- ¿Se puede predecir la concentración letal en sangre de aquellos agentes que presentan una IC50 significativa?.
- ¿Se pueden combinar los resultados de ensayos citotoxicológicos con parámetros toxicocinéticos para predecir la dosis letal aguda humana?.
- ¿La predicción de la dosis letal humana con ensayos citotoxicológicos es más efectiva que la predicción convencional con pruebas con animales?.
- ¿Que combinación de pruebas citológicas es la mejor para establecer un criterio base?.

Las características de estas técnicas hacen que haya un gran interés por parte de las industrias químicas que desarrollan productos de uso directo por el hombre o productos que son susceptibles de ser eliminados a ríos o aguas urbanas. En este último aspecto, existe cada vez más una fuerte presión tanto legal como sanitaria que favorecen la imposición de estas técnicas en industrias como : I. Farmacéutica (medicamentos, cosméticos, etc), I. Textil (tensioactivos, colorantes, auxiliares, etc) e I. Química (fertilizantes, insecticidas, aerosoles, conservantes, etc).

3.1. Utilización de cultivos de células de peces

Los estudios con células de peces merecen ser tratados especialmente ya que a pesar de ser menos numerosos, tienen un gran interés en estudios de ecotoxicidad e impacto ambiental. Estos ensayos ofrecen la posibilidad de valorar el efecto de un compuesto químico sobre "la biota" de aguas continentales y marinas. Los primeros trabajos realizados en este sentido con células de peces fueron llevados a cabo por Pachlin y Perhumber en 1968 y desde entonces los ensayos de citotoxicidad con este tipo de células han sido utilizados por otros investigadores[4] con el propósito de cubrir los siguientes objetivos:

- Crear un rango de medición respecto a la toxicidad aguda de un determinado compuesto.
- Relacionar la citotoxicidad de una serie de agentes respecto a algunos de sus parámetros físico-químicos.
- Estudiar la biotransformación de determinadas toxinas mediante procesos metabólicos.
- Valorar el efecto de la interacción entre combinaciones de diferentes compuestos.

La relación de similitud entre los valores obtenidos en estudios in vitro con células de peces y los ensayos in vivo, ha sido establecida para algunos compuestos analizados por varios autores [10,11]. La utilización de este tipo de células no conlleva grandes consideraciones al efectuar cambios significativos en los protocolos de trabajo, e igualmente sus resultados son equiparables a los esperados en una valoración in vitro con células de mamífero.

El amplio volumen de contaminantes generados por el hombre que son eliminados a través de ríos es muy importante y afecta especialmente a los paises con un alto grado de desarrollo; como ejemplo baste mencionar el hecho de que se han podido identificar más de 1000 derivados químicos de origen industrial en el agua, "biota" y sedimentos de los Grandes Lagos (EEUU-Canadá) por la International Joint Comisión (1983).

Los test LC50 con peces son relativamente costosos y de larga duración, por eso se planteó el desarrollo de técnicas in vitro que sustituyeran parcialmente el uso de bioensayos, para valorar la calidad de las aguas y establecer los límites de presencia de los contaminantes urbanos e industriales.

4. CONCLUSIONES

Miles de productos químicos se someten cada año a rigurosas pruebas ordenadas a valorar su potencial toxicidad. La inmensa mayoría de ellas se realizan con animales: las reacciones que muestran ratas, conejos, ratones y peces ante los preparados químicos constituyen por ahora los mejores ensayos disponibles para predecir los efectos que dichas sustancias ejercerán sobre el organismo.

En la última década, el problema de las pruebas de toxicidad con animales adquirió unos tintes apremiantes y polémicos. Las sociedades protectoras de animales denunciaron el sufrimiento de millones de estos y las industrias que fabrican produc-

tos químicos para el mercado empezaron a preocuparse por los costes y retrasos impuestos por las pruebas.

Como ya hemos mencionado, los riesgos que comporta la utilización de productos peligrosos ha favorecido que los toxicólogos empezaran a estudiar vías alternativas posibles, de manera que su investigación ha introducido una nueva metodología: la de pruebas de toxicidad in vitro.

El estudio de transformaciones metabólicas y procesos de toxicidad y desintoxicación de un compuesto químico puede realizarse no ya utilizando un ser vivo entero, sino tan solo un órgano aislado o una pequeña porción del mismo, o un cultivo de células; siendo muy utilizados los órganos unicelulares, bacterias, huevos de pollo fecundados y embriones de rana. La experiencia in vitro permite establecer unas condiciones que pueden controlarse y muy adecuadas para estudiar el mecanismo de acción de los tóxicos a nivel celular[12] y subcelular y supone una parte de los métodos llamados alternativos propuestos para disminuir el uso de animales de experimentación.

La centrifugación diferencial facilita la obtención de fracciones subcelulares como membranas, microsomas, mitocondrias, polisomas sobre los cuales poder estudiar aisladamente la acción de un tóxico. Pero a pesar de todos estos progresos técnicos que permiten establecer los procesos tóxicos a niveles cada vez más profundos, no podemos olvidar la observación del animal intacto y los tejidos in vivo para no sobrevalorar resultados obtenidos en condiciones en gran medida artificiales.

Con el objetivo de acercar nuestra actividad a los distintos sectores de la sociedad, cabe mencionar que en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigación Textil de Terrassa (UPC) se están iniciando los estudios de toxicidad in vitro con lineas celulares de peces. Pruebas preliminares de la puesta a punto de la metodología in vitro están siendo llevadas a cabo bajo la colaboración y supervisión del Instituto de Biología Fundamental.

El desarrollo de actividades en esta linea de citotoxicidad in vitro, permitirán a nuestro grupo de trabajo entrar a formar parte de la red de laboratorios del programa Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity (MEIC) iniciado por la Sociedad Escandinava de Toxicología Celular en 1987. Dicho programa MEIC está compuesto por más de 80 laboratorios en todo el mundo, 50 de los cuales están trabajando con los 20 tóxicos de mayor interés.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan el agradecimiento a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del MEC, por su apoyo financiero al proyecto PB91-0286 en el que se incluye el presente trabajo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Acosta D. et al, A in vitro approach to the study of target organ toxicity of drugs and chemicals. In vitro cellular and development Biology, vol. 21, nº 9, 495-505, (1985).
2. Ian Freshney, R.,Culture of animal cells., A manual of basic techniques, 2nd ed. Alan R. Liss, Inc. New York, (1987).
3. Wallum,E., Stenberg, K. and Jenssen, D. Understanding cell toxicology, Principles and Practice, ed. Ellis Horwood (1990).
4. Babich, H. and Borenfreund, E., Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review., Toxic in vitro vol 5, nº 1, (1991).
5. Kaltenbach, J.P., Kaltenbach, M.H. & Lyons, W.B. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. Exptl. Cell res. **15**,112-117. (1958).
6. Rotman and Papermaster (1966) en R. Ian Freshney Culture of animal cells. A manual of basic techniques, 2nd ed. Alan R. Liss, Inc New York, (1987).
7. Clothier, R.H.The frame cytotoxicity test (kenacid blue) protocolo nº 3b . INVITTOX, (1992).
8. Supino, R. MTT assay, protocolo nº 17. INVITTOX, (1990).
9. Priestley, G..Human skin fibroblast / collagen tallice cytotoxicity test, protocolo nº 27 INVITTOX, (1990).
10. Babich, H. et al, In vitro cytotoxicity testing of metals to blugill (1986), en H. Babich and E. Borenfreund, Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cell: a review, Toxic. in vitro vol. 5, nº 1,(1991)
11. Bols et al. The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish .En H. Babich and E. Borenfreund, Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cell; a review. Toxic. in vitro vol 5, nº 1, (1991).
12. Brusich D.J., In vitro mutagenesis assays as predictors of chemical carinogenesis in mammals. In Toxicology annual vol. 2 by Ch. L. Winek ed. Marcel Dekher in NewYork, 79-109, (1977).

Trabajo recibido en 1993.09.3
Aceptado 1993.10.1