

### **NOTA IMPORTANTE:**

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

**ININ/ Oficina Nacional de Normalización**

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

**NC-ISO 10993-3: 2005**  
**(Publicada por la ISO en 2003)**

---

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EQUIPOS MÉDICOS—  
PARTE 3: ENSAYOS RELATIVOS A LA GENOTOXICIDAD,  
LA CARCINOGENICIDAD Y LA TOXICIDAD SOBRE LA  
REPRODUCCIÓN  
(ISO 10993-3:2003, IDT)**

**Biological evaluation of medical Devices—Part 3: Tests for genotoxicity,  
carcinogenicity and reproductive toxicity**

---

**ICS: 11.100**

**1. Edición    Noviembre 2005**  
**REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

**Oficina Nacional de Normalización Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.  
Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048 Correo electrónico: nc@ncnorma.cu;  
Sitio Web: [www.nc.cubaindustria.cu](http://www.nc.cubaindustria.cu)**



**Cuban National Bureau of Standards**

## Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencia de consenso.

### Esta Norma Cubana:

- Ha sido revisada y adoptada por el Comité Técnico de Normalización No. 11 de Equipos Médicos representado por las siguientes instituciones:
  - Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (CCEEM)
  - Centro para el Control Estatal de la Calidad de Medicamentos
  - Grupo Nacional de Anestesiología
  - Grupo Nacional de Estomatología
  - Grupo Nacional de Cirugía
  - Grupo Nacional de Cirugía Plástica
  - Centro Nacional de Electromedicina
  - Instituto de Investigaciones en Normalización
  - Instituto de Investigaciones en Metrología
  - Instituto Central de Investigación Digital
  - Comisión Asesora de Equipos Médicos
  - MEDICUBA
  - Red Funcional de Implantología
  - Biomateriales
  - Complejo Ortopédico "Frank País"
  - Oficina Nacional de Normalización

### © NC, 2005

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC)**

**Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

## Índice

<b>ANTECEDENTES</b> .....	5
<b>0 Introducción</b> .....	6
<b>1 Alcance</b> .....	7
<b>2 Normas de referencia para consulta</b> .....	7
<b>3 Términos y definiciones</b> .....	8
<b>4 Ensayos de genotoxicidad</b> .....	9
<b>4.1 Generalidades</b> .....	9
<b>4.2 Estrategia para los ensayos</b> .....	9
<b>4.3 Preparación de las muestras</b> .....	10
<b>4.4 Métodos de ensayo</b> .....	11
<b>4.4.1 Ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i></b> .....	11
<b>4.4.2 Ensayos de genotoxicidad <i>in vivo</i></b> .....	11
<b>5 Ensayos de carcinogenicidad</b> .....	11
<b>5.1 Generalidades</b> .....	11
<b>5.2 Estrategia para los ensayos</b> .....	12
<b>5.3 Preparación de la muestra</b> .....	12
<b>5.4 Métodos de ensayo</b> .....	12
<b>6 Ensayos de toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo</b> .....	13
<b>6.1 Generalidades</b> .....	13
<b>6.2 Estrategia de ensayos</b> .....	13
<b>6.3 Preparación de la muestra</b> .....	14
<b>6.4 Métodos de ensayo</b> .....	14
<b>7 Informe</b> .....	14
<b>Anexo A_(informativo)</b> .....	16

Anexo B (informativo)..... 17

Anexo C\_(informativo)..... 19

BIBLIOGRAFIA ..... 22

## ANTECEDENTES

Esta Norma Cubana es la adopción de la Norma ISO 10993-3: 2003, recomendada por el Comité Técnico de Normalización No. 11 de Equipos Médicos, cuya actividad es homóloga al Comité ISO/TC 194 Evaluación Biológica de Equipos Médicos de la Organización Internacional de Normalización.

La Norma ISO 10993 comprende las partes siguientes, presentadas con el título general de "Evaluación Biológica de los Equipos Médicos".

- Parte 1: Evaluación y Ensayos
- Parte 2: Requerimientos para el bienestar de los animales.
- Parte 3: Ensayos de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad reproductiva.
- Parte 4: Selección de ensayos de interacciones con la sangre.
- Parte 5: Ensayos de citotoxicidad.
- Parte 6: Ensayos de efectos locales después de la implantación.
- Parte 7: Residuos de la esterilización por óxido de etileno.
- Parte 8: Guía para los materiales de referencias.
- Parte 9: Sistema para la identificación y cuantificación de potenciales productos de degradación.
- Parte 10: Ensayos de irritación y de sensibilización.
- Parte 11: Ensayos de toxicidad sistémica.
- Parte 12: Preparación de las muestras y materiales de referencia.
- Parte 13: Identificación y cuantificación de productos de degradación de polímeros
- Parte 14: Identificación y cuantificación de productos de degradación de cerámicas.
- Parte 15: Identificación y cuantificación de productos de degradación de metales y aleaciones.
- Parte 16: Diseño de estudio toxicocinético para productos de degradación y lixiviación.
- Parte 17: Establecimiento de los límites permisibles para sustancias lixiviables.
- Parte 18: Caracterización de materiales.

Otros aspectos relevantes de la evaluación biológica serán tratados posteriormente.

## 0 Introducción

Las bases para la evaluación de equipos médicos a menudo son empíricas y dirigidas a aspectos relevantes que conciernen a la seguridad humana. Los riesgos de sufrir efectos serios e irreversibles como el cáncer o la aparición de anomalías en una segunda generación, es un asunto concerniente a la opinión pública. Es una cuestión inherente en el momento de adquirir un equipo médico seguro que tales riesgos sean minimizados tanto como sea posible. La estimación de los riesgos mutagénicos, carcinogénicos y sobre la reproducción es un componente esencial del control de tales riesgos. No todos los métodos de ensayos para la estimación de la genotoxicidad, de la carcinogenicidad o la toxicidad reproductiva se encuentran igualmente bien desarrollados, así como tampoco ha sido bien establecida la validación para los ensayos con equipos médicos.

Se han citado en múltiples ocasiones como limitaciones en los métodos disponibles, dificultades significativas con respecto al tamaño de la muestra y su preparación, la comprensión científica de los procesos de la enfermedad y la validación de los ensayos, como por ejemplo, el significado biológico de la carcinogénesis debida al estado sólido. Se espera que los avances científicos y médicos en curso cambien nuestra comprensión y enfoque de estos importantes métodos de ensayo sobre la toxicidad. En el momento de la elaboración, los métodos de ensayos que se describen son los más aceptados. Se admitirán otras alternativas científicas para los ensayos propuestos, en la medida en que aborden los aspectos relevantes para la evaluación de la seguridad.

Durante la selección de los ensayos necesarios para la evaluación de un equipo particular, no existe un sustituto para una estimación cuidadosa de la utilización prevista en las personas y de las interacciones potenciales entre el producto y los diferentes sistemas biológicos. Estas consideraciones serán particularmente importantes en áreas tales como la toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo.

Esta parte de la norma ISO 10993 presenta los métodos de ensayos necesarios para la detección de los riesgos biológicos específicos y las estrategias para la selección de los ensayos, donde sea apropiado, que pueda asistirnos en la identificación del riesgo. Los ensayos no son siempre necesarios o de gran ayuda en la identificación del riesgo pero donde sean apropiados es preciso el máximo nivel de sensibilidad en la ejecución de los ensayos. Muchos de los ensayos incluidos en esta parte de las ISO 10993 se refieren a las Guías para los Ensayos de Sustancias Químicas (Guidelines for Testing of Chemicals) establecidas por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo.

La interpretación de los resultados y sus implicaciones para la salud humana no se encuentran dentro del objeto de esta parte de la ISO 10993. Debido a la multiplicidad de posibles resultados y la importancia de determinados factores tales como la duración de la exposición, a las diferencias entre las especies y las consideraciones mecánicas o físicas, la evaluación se deberá realizar caso por caso.

## EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EQUIPOS MÉDICOS—PARTE 3: ENSAYOS RELATIVOS A LA GENOTOXICIDAD, LA CARCINOGENICIDAD Y LA TOXICIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN

### Alcance

Esta parte de la Norma ISO 10993 especifica las estrategias para la identificación de los riesgos y los ensayos con equipos médicos para los aspectos biológicos siguientes:

- Genotoxicidad
- Carcinogenicidad, y
- Toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo.

Esta parte de la ISO es aplicable para la evaluación de un equipo médico con potencial identificable de índole genotóxico, carcinogénicos o de toxicidad sobre el desarrollo.

**NOTA:** La guía para la selección de los ensayos se encuentra en la ISO 10993-1.

### 2 Normas de referencia para consulta

Las siguientes normas referenciadas contienen disposiciones, indispensables para la aplicación de esta Norma Internacional. En el momento de su publicación, la edición que se indica era válida. Todas las normas están sujetas a revisión y se anima a cada una de las partes, que basan sus acuerdos en esta Norma Internacional, para que se investigue la posibilidad de aplicar la edición más reciente de las normas que a continuación se mencionan.

ISO 10993-1: 2003 - Evaluación biológica de los equipos médicos. Parte 1: Directrices para la ejecución de las evaluaciones y ensayos.

ISO 10993-2: 1992 – Evaluación biológica de los equipos médicos. Parte 2: Requisitos relativos a la protección de los animales.

ISO 10993-6: 1994 – Evaluación biológica de los equipos médicos. Parte 6: Ensayo para medir los efectos locales después de la implantación.

ISO 10993-12: 2002 – Evaluación biológica de los equipos médicos. Parte 12: Preparación de las muestras y materiales de referencias.

ISO 10993-18, Evaluación biológica de los equipos médicos. Parte 18: Caracterización química de los materiales.

OECD 414<sup>1</sup> Estudio de toxicidad sobre el desarrollo prenatal (teratogénesis).

OECD 415 Estudio de toxicidad sobre una generación

---

<sup>1</sup> Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo

OECD 416 Estudio de toxicidad sobre dos generaciones.

OECD 421 Estudio screening de toxicidad sobre Reproducción/Desarrollo.

OECD 451 Estudios de carcinogenicidad.

OECD 453 Estudio de toxicidad crónica combinada/ Estudios de carcinogenicidad.

OECD 471 Estudio de mutación reversa en bacteria.

OECD 473 Estudio *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamíferos.

OECD 476 Estudio *in vitro* de mutación génica en células de mamíferos.

### **3 Términos y definiciones**

Para el propósito de esta parte de la Norma ISO 10993, se aplican las definiciones dadas en la Norma ISO 10993-1, la Norma ISO 10993-12, así como las definiciones siguientes:

#### **3.1 Ensayo de carcinogenicidad:**

Ensayo destinado a determinar el potencial tumoral de un equipo médico, materiales y/o extractos por medio de exposiciones únicas o repetidas en una parte de la vida del animal de ensayo

**NOTA:** Este ensayo puede ser diseñado para examinar tanto la toxicidad crónica como carcinogénica en un estudio experimental único. Cuando la toxicidad crónica y carcinogénica es evaluada con un único estudio, se debe ser excesivamente cuidadoso con la selección de las dosis. Esto ayudará a asegurar que una mortalidad prematura a partir de una toxicidad crónica y/o acumulativa no comprometa la evaluación estadística de los animales que sobrevive hasta la terminación de los esquemas de tratamiento.

#### **3.2 equipo médico emisor de energía:**

Dispositivo destinado a ejercer su efecto terapéutico o de diagnóstico por medio de la emisión de radiación electromagnética, radiación ionizante o ultrasónica.

**NOTA:** Esta definición no incluye los dispositivos que emiten corriente eléctrica simple como los electrocauterizantes, los marcapasos o los estimuladores eléctricos funcionales.

#### **3.3 Ensayo de genotoxicidad:**

Ensayo que se realiza a las células de mamíferos o no, bacterias, levaduras u hongos, para determinar si las mutaciones genéticas, los cambios de estructura cromosómica u otras alteraciones del ADN o de los genes se producen a causa de la exposición de los materiales, los productos y/o los extractos de los materiales.

**NOTA:** Los ensayos in vivo con animales pueden estar encaminados hacia estos fines.

#### **3.4 Dosis máxima tolerable (DMT):**

Dosis máxima del material a evaluar que un animal de ensayo puede tolerar sin experimentar efectos adversos físicos o mecánicos.

#### **3.5 Ensayo de toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo:**

Ensayo destinado a evaluar los efectos potenciales de los productos, materiales y/o extractos sobre la función reproducción, el desarrollo morfológico embrionario (teratogenicidad) y el desarrollo prenatal y postnatal temprano.

## 4 Ensayos de genotoxicidad

### 4.1 Generalidades

Antes de tomar la decisión para la ejecución de un ensayo de genotoxicidad debe tomarse en cuenta el contenido de la norma ISO 10993-1 y la caracterización química de los materiales (ISO 10993-18). La racionalidad de un programa de ensayo, debe tomar en consideración todos los factores relevantes que se encuentren debidamente documentados.

La ISO 10993-1 indica circunstancias donde el potencial para la genotoxicidad, es un riesgo realmente relevante a considerar en una evaluación de seguridad biológica (ver ISO 10993-1, 2003, tabla 1). Los ensayos de genotoxicidad, sin embargo, no son necesarios para los equipos médicos y componentes de estos, que se encuentren constituidos a partir de materiales conocidos por no mostrar genotoxicidad.

Los ensayos de genotoxicidad son indicados donde una revisión de la composición de los materiales revela la posible presencia en el equipo médico final de compuestos que puedan interactuar con el material genético o cuando la composición química del equipo médico es desconocida. En tales circunstancias el potencial genotóxico de los componentes químicos sospechosos debe ser estimada teniendo en cuenta el potencial para fenómenos de sinergia, y con preferencia para llevar a cabo los ensayos de genotoxicidad, sobre el material o el equipo médico en su conjunto.

Cuando la genotoxicidad de un equipo médico deba ser experimentalmente estimada, se deben llevar a cabo series de ensayos *in vitro*. En estas series deben ser incluidos al menos dos ensayos si se toma en cuenta el acápite 4.2.1.2 para ser llevado a cabo, en el cual se utiliza el ensayo de linfoma en ratón, incorporando la determinación del número y tamaño de colonias, o tres ensayos si se toma en cuenta el acápite 4.2.1.1 para ser llevado a cabo. Cuando estos ensayos son llevados a cabo en células de mamíferos, se deben ejecutar al menos 2 ensayos con vistas a investigar diferentes objetivos.

### 4.2 Estrategia para los ensayos

**4.2.1** Los ensayos de genotoxicidad deberán ser ejecutados sobre las bases de una decisión inicial de llevar a cabo investigaciones ya sea con la opción 1 (4.2.1.1) o con la opción 2 (4.2.1.2).

#### 4.2.1.1 Opción 1

- a) un ensayo para medir mutación génica en bacteria (OECD 471); y
- b) un ensayo para medir mutaciones génicas en células de mamíferos (OECD 476); y
- c) un ensayo para medir clastogenicidad en células de mamíferos (OECD 473)

#### 4.2.1.2 Opción 2

- a) un ensayo para medir mutación génica en bacteria (OECD 471); y
- b) un ensayo para medir mutaciones génicas en células de mamíferos (OECD 476); específicamente en el ensayo de linfoma de ratón con incorporación de la determinación del número y tamaños de colonias en orden a cubrir dos objetivos (clastogenicidad y mutaciones génicas).

**4.2.2** Si los resultados de todos los ensayos *in vitro* llevados a cabo de acuerdo al acápite 4.2.1 son negativos, no se justifica la ejecución de otros ensayos de genotoxicidad en animales, en interés de prevenir el indebido uso de animales.

Los ensayos *in vivo* que se ejecuten deberán ser llevados a cabo de acuerdo con la norma ISO 10993-2.

**4.2.3** Si algún ensayo *in vitro* es positivo, deberá llevarse a cabo ensayos de mutagenicidad *in vivo* (ver 4.2.4) o se debe presumir que el compuesto es mutagénico.

**4.2.4** Cualquier ensayo *in vivo* deberá ser seleccionado pero sobre todo se debe elegir sobre las bases de ser el que se ejecuta con objetivos más apropiados a los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*. Se debe demostrar que la sustancia de prueba alcanza el órgano diana. Si no puede ser demostrado, un segundo ensayo *in vivo* con otro órgano diana será requerido para verificar la ausencia de genotoxicidad *in vivo*.

Los ensayos *in vivo* más comúnmente utilizados son:

- a) ensayo de micronúcleos en roedores (OECD 474) o
- b) análisis de metafases en médula ósea de roedores (OECD 475) o
- c) ensayo de síntesis no esquemática de DNA en células hepática de mamíferos (OECD 486)

La decisión para llevar a cabo el sistema más apropiado de evaluación deberá ser justificada y debidamente documentada.

**4.2.5** Si se utiliza cualquier otro sistema de ensayo *in vivo* para investigar la genotoxicidad con vistas a obtener información adicional, la racionalidad para esto deberá estar debidamente justificada y documentada.

### 4.3 Preparación de las muestras

**4.3.1** Cuando los ensayos de genotoxicidad son llevados a cabo sobre un material o un equipo médico o sobre un todo, la preparación de las muestras deberá ser de acuerdo a la norma ISO 10993-12. Los ensayos deberán ser llevados a cabo en extractos, extractos exagerados o sobre compuestos químicos individuales del material o equipo médico. La mayor concentración a ensayar se hará dentro de los lineamientos de la OECD. Si se utilizan condiciones de extracción exageradas, se deberá tomar cuidado de que éstas no alteren las características químicas de la sustancia a ensayar.

**4.3.2** Se debe seleccionar un solvente adecuado sobre la base de su compatibilidad con el sistema de ensayo y su capacidad para maximizar la extracción del material o del equipo médico. La racionalidad para la elección del solvente deberá ser bien documentada.

**4.3.3** Donde sea relevante, se deberán utilizar dos sustancias de extracción apropiadas, una de ellas con características polares mientras que la segunda deberá ser con características no polares o un líquido apropiado a la naturaleza y uso del equipo médico, y compatibles con el sistema de ensayo.

## **4.4 Métodos de ensayo**

### **4.4.1 Ensayos de genotoxicidad *in vitro***

Los métodos de ensayo para ensayos de genotoxicidad *in vitro* deberán ser seleccionados a partir de los lineamientos de la OECD para los Ensayos de Sustancias Químicas.

Los métodos de ensayos preferidos son: OECD 471, OECD 473, OECD 476, OECD 479 y OECD 482. Es necesario considerar, en el diseño y selección de los ensayos, que un gran número de materiales o sustancias pueden influenciar en los resultados del mismo, como por ejemplo antibióticos y antisépticos. Si este aspecto es relevante, la racionalidad para la decisión de su ejecución deberá ser documentada.

### **4.4.2 Ensayos de genotoxicidad *in vivo***

Los métodos de ensayo para los ensayos de genotoxicidad *in vivo* deberán ser seleccionados a partir de los lineamientos de la OECD para los Ensayos de Sustancias Químicas.

Los métodos de ensayos preferidos son: OECD 474, OECD 475, OECD 478, OECD 483, OECD 484, OECD 485 y OECD 486.

**NOTA:** Recientemente, los sistemas de ensayo con animales transgénicos han sido desarrollados para los ensayos de genotoxicidad. Tales métodos parecen ser valiosos y útiles para probar equipos médicos, pero su utilización no ha sido aún validada en el momento de la publicación de esta parte de la ISO 10993. Las referencias de los sistemas de ensayo son dadas en la bibliografía acerca de animales transgénicos.

## **5 Ensayos de carcinogenicidad**

### **5.1 Generalidades**

Antes de llevar a cabo ensayos de carcinogenicidad, el contenido de las normas ISO 10993-1 e ISO 10993-18 deberá ser tomado en consideración. La decisión para llevar a cabo tales ensayos deberá estar bien justificada sobre la base de una estimación de los riesgos de carcinogenicidad que se deriven del uso del equipo médico. El ensayo de carcinogenicidad no se deberá llevar a cabo cuando los riesgos sean adecuadamente estimados o manejados sin la generación de nuevos datos derivados de ensayos de carcinogenicidad.

**NOTA:** El sistema de transformación celular *in vitro* es un método apropiado que puede ser utilizado como un ensayo pre-tamizaje para la carcinogenicidad. Los ensayos de transformación celular no se encuentran

descritos en las Normas Internacionales, por lo que una información adicional acerca de este ensayo es brindada en el Anexo A.

## **5.2 Estrategia para los ensayos**

**5.2.1** En ausencia de evidencias que desechen los riesgos carcinogénicos, las situaciones en las cuales la necesidad de ensayos de carcinogenicidad deba ser considerada, ésta deberá incluir las siguientes consideraciones:

- a) materiales reabsorbibles y equipos médicos para los cuales el tiempo de reabsorción es mayor de 30 días, a menos que existan datos significativos y adecuados acerca de su uso humano o exposición.
- b) materiales y equipos médicos que deban ser introducidos en el cuerpo y/o sus cavidades con un contacto permanente o acumulativo mayor de 30 días, excepto cuando se encuentre disponible un historial de uso humano adecuado y significativo.

Los ensayos de carcinogenicidad de materiales genotóxicos no se encuentran científicamente justificados. Para materiales genotóxicos el riesgo de carcinogenicidad deberá ser presumido y se deberá hacer un manejo de riesgo adecuado.

**5.2.2** Cuando de acuerdo con la ISO 10993-1, se deba considerar llevar a cabo ensayos de toxicidad crónica y de carcinogenicidad, los ensayos deberán ser llevados a cabo de acuerdo con la OECD 453, de ser posible.

**5.2.3** Cuando de acuerdo con la ISO 10993-1, se deba considerar llevar a cabo solo un estudio de carcinogenicidad, y es determinado que éste es necesario, los ensayos deberán ser llevados a cabo de acuerdo con la OECD 451, de ser posible.

**5.2.4** Una sola especie animal es suficiente para los ensayos con equipos médicos. La selección de la especie deberá estar bien justificada y documentada.

**NOTA:** Recientemente, han sido desarrollados sistemas de ensayo con animales transgénicos para los ensayos de carcinogenicidad, pero su utilización no ha sido aún validada en el momento de la publicación de esta parte de la ISO 10993. Las referencias de estos sistemas de ensayo son dadas en la bibliografía como alternativas para ensayos de carcinogenicidad.

## **5.3 Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra deberá estar de acuerdo con el contenido de la norma ISO 10993-12. Siempre que sea posible, el equipo médico deberá ser ensayado de forma representativa en su estado de utilización ("apto para su uso").

## **5.4 Métodos de ensayo**

**5.4.1** Si los ensayos de carcinogenicidad son necesarios como parte de una evaluación de seguridad biológica, estos estudios deberán ser llevados a cabo con sustancias químicas definidas o con extractos bien caracterizados del equipo médico. La ejecución de estudios de implantación (ver Anexo C) deberá estar justificada, y el papel en la evaluación de los riesgos humanos deberá ser descrito y documentado.

**5.4.2** Si debiera ser ejecutado un estudio de implantación, las consideraciones deberán ser dadas a partir del uso clínico del equipo médico en la selección del sitio de implante.

**5.4.3** Si el ensayo de un extracto es considerado relevante, los ensayos de carcinogenicidad se deberán llevar a cabo de acuerdo con la OECD 451 o la OECD 453.

**5.4.4** Los tejidos a tomar para ser evaluados deberán incluir tejidos relevantes a partir de la lista indicada en la OECD 451 o en la OECD 453, así como es conveniente tomar el tejido donde se realizó la implantación así como el tejido adyacente.

## **6 Ensayos de toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo**

### **6.1 Generalidades**

**6.1.1** Antes de llevar a cabo ensayos de toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo, se debe tomar en consideración el contenido de la ISO 10993-1 y de la ISO/DIS 10993-18. La decisión para llevar a cabo un ensayo deberá estar justificada sobre las bases de una estimación en el riesgo de toxicidad para la reproducción y para el desarrollo que conlleva la utilización del equipo médico.

**6.1.2** Estos ensayos no son necesarios para equipos médicos reabsorbibles o equipos médicos que contengan sustancias lixiviables, si existen datos adecuados y tranquilizadores de estudios de absorción, metabolismo y distribución o de ausencia de toxicidad reproductiva de todos los componentes identificados en los extractos de los materiales o del equipo médico.

**6.1.3** Los ensayos de toxicidad reproductiva y de desarrollo no son necesarios cuando una estimación aceptable del riesgo biológico desecha el riesgo de toxicidad reproductiva y del desarrollo.

### **6.2 Estrategia de ensayos**

En ausencia o evidencia para desechar riesgos reproductivos y/o del desarrollo, deberá tomarse en consideración llevar a cabo ensayos de reproducción y desarrollo. Deben incluirse ensayos en base a:

- a) equipos con contacto permanente o prolongado que lleven a un contacto directo con tejidos reproductores o en contacto con el embrión o feto.
- b) equipos médicos emisores de energía
- c) materiales reabsorbibles o sustancias lixiviables

Si los ensayos son necesarios, se deberá consultar la OECD 421 en orden a proveer una información inicial sobre posibles efectos sobre la reproducción y/o el desarrollo. Los resultados positivos con estos ensayos serán útiles para estimar riesgos iniciales y contribuir a decisiones con respecto a la necesidad para llevar a cabo ensayos adicionales.

Si se considera llevar a cabo ensayos adicionales, éstos deberán estar en acuerdo con la OECD 414, OECD 415 o OECD 416, como sean apropiados.

### 6.3 Preparación de la muestra

**6.3.1** La preparación de la muestra se realizará de acuerdo con la ISO 10993-12. siempre que sea posible, el equipo médico deberá ser ensayado de forma representativa en su estado de utilización (“apto para su uso”).

**6.3.2** En el caso de los productos emisores de energía, es apropiado irradiar todo el cuerpo del animal. Un múltiplo de la dosis prevista para el hombre deberá ser aplicada en el órgano reproductor.

**6.3.3** La dosis máxima utilizada en los animales será la dosis máxima tolerada o limitada a las características físicas del modelo animal. Siempre que sea posible, esta dosis deberá expresarse como un múltiplo de la exposición humana máxima (en masa y/o área de superficie de dosis por kilogramos del sujeto).

Los ensayos *in vivo* deberán llevarse a cabo de acuerdo con la ISO 10993-2.

### 6.4 Métodos de ensayo

**6.4.1** La evaluación de los efectos sobre la primera generación (F1) o incluso de segunda generación (F2) deberá realizarse de acuerdo con las directrices de la OECD 414, OECD 415 o la OECD 416 y la OECD 421. Como las directrices de la OCDE no fueron previstas para los equipos médicos, se deberá considerar las modificaciones siguientes:

- la dosis (en el caso de los productos emisores de energía);
- la ruta de aplicación (implantable, parenteral, otras);
- extracción media (extractos acuosos y no acuosos);
- el tiempo de exposición (niveles sanguíneos elevados durante la organogénesis, cuando sea posible).

**NOTA:** Dependiendo del uso humano previsto y las características del material, se pueden indicar estudios peri-/post-natales.

**6.4.2** Si la información que se deriva de otros ensayos indica efectos potenciales sobre el sistema reproductor masculino, se realizarán entonces ensayos adecuados a la toxicidad en el sistema reproductor masculino.

Nota: Recientemente se han desarrollado sistemas de ensayo *in vitro* relativos a la reproducción. Estos pueden resultar muy útiles como un método de estudio preliminar de la toxicidad sobre la reproducción. Se hace referencia a sistemas de ensayo *in vitro* relativos a la reproducción en la bibliografía.

## 7 Informe

**7.1** El informe deberá incluir al menos los siguientes detalles, cuando sea relevante:

- a) descripción del material y/o equipo incluyendo el uso propuesto (por ejemplo, la composición química, procesamiento, condiciones y tratamiento de superficie).

- b) descripción y justificación de los métodos de ensayo, materiales de ensayo y procedimientos de ensayo.
- c) descripción de los métodos analíticos incluyendo los límites de cuantificación.
- d) estado de complementariedad con las buenas prácticas de laboratorio
- e) resultados del ensayo, incluyendo un resumen de éstos.
- f) métodos estadísticos empleados
- g) interpretación y discusión de los resultados.

**7.2** Otros detalles como los especificados en los lineamientos de la OECD deben ser incluidos en los informes, si es aplicable y apropiado.

**Anexo A**  
(informativo)

**Sistema de ensayo de transformación celular**

El sistema de ensayo de transformación celular deberá ser utilizado para ensayos pre-tamizaje de carcinogenicidad.

La guía es dada en (12) para los ensayos de transformación celular *in vitro*. Otras referencias de los sistemas de ensayos de transformación celular se muestran en la bibliografía para los ensayos de transformación celular.

Existen algunas evidencias de que en un ensayo de dos pasos de transformación celular puedan ser detectados carcinógenos que no son genotóxicos, pero al mismo tiempo no es posible concluir que todos los carcinógenos no genotóxicos puedan ser detectados mediante el ensayo de transformación celular. Por consiguiente, el sistema de ensayo de transformación celular no puede ser utilizado como una alternativa para estudios de carcinogenicidad de larga vida en al menos una especie roedora apropiada.

## **Anexo B** (informativo)

### **Racionalización de los sistemas de ensayo**

#### **B.1 Ensayos de genotoxicidad**

La función fundamental de los ensayos de genotoxicidad es investigar, utilizando ensayos en células u organismos, el potencial de los productos para inducir cambios genéticos en el hombre que puedan ser transmitidos a través de las células germinales a futuras generaciones. Los datos científicos generalmente soportan la hipótesis de que el daño al DNA en células somáticas es un evento crítico para la iniciación de un cáncer. Tales daños pueden resultar en mutaciones, y los ensayos para detectar la actividad genotóxica puede también identificar agentes químicos que tienen potencial para llevar a cabo una carcinogénesis. Así, algunos de estos ensayos son útiles para la investigación de la actividad carcinogénica, aunque no posean estrictamente estos propósitos.

Mientras que en los ensayos toxicológicos clásicos numerosos parámetros pertinentes pueden ser observados con un diseño experimental, esto no es válido para la genética toxicológica. La diversidad de los objetivos genéticos usualmente excluye la detección de más de uno de ellos en un único sistema de ensayo.

Aproximadamente 15 diferentes ensayos han sido citados en los lineamientos de los ensayos. La selección del más apropiado de ellos para conocer un requerimiento particular es gobernado por numerosos factores. Estos incluyen el tipo de cambio genético que es requerido para detectar o la capacidad metabólica del sistema de ensayo.

Debe ser enfatizado que no existe un acuerdo internacional acerca de la mejor combinación de ensayos con un propósito particular, aunque han existido intentos por armonizar la selección de los más apropiados ensayos. Debemos notar además, que existen otros ensayos de mutagenicidad en uso o en desarrollo los cuales, aunque no se encuentran en las guías de la OECD, también pueden ser útiles. La existencia del acuerdo ICH/S2B para productos farmacéuticos es una prueba de ello que debe ser señalada.

Los agentes químicos que interactúan con el ADN producen lesiones las cuales después de sufrir la influencia de varios procesos de reparación, pudieran conllevar a cambios genéticos a nivel génico, como por ejemplo en genes o en mutaciones puntuales, pequeñas deleciones, recombinación mitótica o varios cambios cromosómicos visibles. Para investigar cada uno de estos cambios existen ensayos específicos.

Actualmente, existen ensayos de corta duración que simulan todas las etapas de los procesos carcinogénicos y son frecuentemente asumidos para detectar solo el evento que lleva a la fase de iniciación, como por ejemplo la capacidad para inducir una lesión mutagénica o clastogénica sobre el ADN. El valor principal de estos procedimientos, reside en su habilidad para identificar sustancias que puedan bajo ciertas condiciones de exposición, causar incluso cáncer mediante un mecanismo predominantemente genotóxico o inducir la fase inicial de procesos carcinogénicos. Es aparentemente, a partir de la complejidad de los procesos carcinogénicos comparado con la relativa simplicidad de los ensayos cortos, que, aunque estos proveen información cualitativamente útil, es necesario tener una considerable cautela en su interpretación en términos de su actividad carcinogénica.

Mientras no exista un único ensayo capaz de detectar mutágenos en mamíferos y carcinógenos con un aceptable nivel de precisión y reproducibilidad, es usual en la práctica científica aplicar estos ensayos en baterías. La información inicial sobre la mutagenicidad de una sustancia puede ser obtenida utilizando ensayos que midan las mutaciones génicas y el daño cromosómico. Debido a que deben ser utilizados procedimientos separados para investigar estos objetivos, es necesario utilizar baterías de ensayos.

### **B.2 Estudios de carcinogenicidad**

El objetivo del estudio de carcinogenicidad a largo plazo es observar los biomodelos animales en una gran porción de su vida media, para observar el desarrollo de lesiones neoplásicas, durante o después de su exposición en una ruta de administración apropiada a varias dosis de la sustancia de ensayo. Cada ensayo de esta magnitud requiere de un planeamiento adecuado y documentación del diseño experimental (ver Anexo C), un análisis patológico de alta calidad y un análisis estadístico apropiado.

### **B.3 Ensayos de toxicidad reproductiva y del desarrollo**

Los ensayos de toxicidad sobre la reproducción cubren los aspectos de reproducción, fertilidad y teratogenicidad. Ha sido encontrado que muchas sustancias pueden afectar la fertilidad y la reproducción, a menudo de una manera insidiosa sin mostrar otros signos de toxicidad. La fertilidad puede ser afectada tanto en machos como en hembras, y sus efectos pueden encontrarse en rangos de ligeros decrementos de la capacidad reproductora a una esterilidad completa.

Los estudios de teratogenicidad tienen el objetivo de detectar los efectos adversos de una sustancia sobre el desarrollo de un embrión o feto. La toxicidad reproductiva tiene un importante soporte en la salud del género humano. Las técnicas de ensayo han sido bien desarrolladas y el concepto de ensayos combinados, que cubre todos los aspectos de la toxicología reproductiva, parece ser promisorio.

## **Anexo C** (informativo)

### **Papel de la implantación en los estudios de carcinogenicidad.**

#### **C.1 Generalidades**

Los tumores inducidos a causa de implantes han sido bien conocidos utilizando ratas. Este fenómeno es llamado "carcinogénesis por un cuerpo extraño". El fenómeno es resumido a continuación:

Los tumores que frecuentemente se desarrollan alrededor o cercano a un implante dependen de numerosos factores:

- a) el tamaño del implante (grandes implantes generalmente producen más frecuentemente sarcoma que en el caso de pequeños implantes)
- b) su forma (los discos están reportados entre los más eficiente)
- c) uniformidad de su superficie (aquellos que tengan superficies ásperas son menos carcinogénicos que los que posean superficies lisas)
- d) la continuidad del área de superficie (el mayor tamaño de los agujeros o poros, tiene la menor incidencia de tumores)
- e) para ciertos materiales, su grosor (implantes gruesos producen frecuentemente sarcomas)
- f) el tiempo que el implante permanece en el tejido

El mismo material que produce tumores como una membrana o láminas será, en la mayoría de los casos, el que produce fiebre o no produce tumores cuando es implantado como un polvo, en hilos o filamentos o como un material poroso (33,34).

Por otra parte, muchos reportes indican una diferencia en la incidencia de formación de tumores entre diferentes materiales de similar forma y tamaño utilizando el mismo protocolo de experimentación animal.

Los mecanismos para su comprensión se encuentran resumidos en una Monografía de la IARC (35).

#### **C.2 Los procesos y racionalidad de decisión**

Bajo estas circunstancias, el Grupo de Trabajo ha reconsiderado los actuales lineamientos en la ISO 10993-3 sobre el diseño de los estudios de carcinogenicidad.

Este Grupo de Trabajo presentó datos obtenidos utilizando un protocolo específico para materiales implantables con forma definida y consistente (36). Este protocolo involucró 2 años de implantación subcutánea de un implante de membrana de unas dimensiones de 10 mm x 20 mm x (0.5 mm a 1.0 mm) en 30 a 50 ratas machos de las líneas Wistar o F344 en las cantidades

establecidas. Estos datos demostraron un incremento significativo en el número de tumores detectados para todos los materiales ensayados en el ensayo con animales comparado con controles a los que se fingió operar, incluyendo los controles negativos nominales. La proporción de los animales de ensayo con tumores estuvieron en un rango desde un 7% para la silicona hasta un 70 % para el polietileno, sin embargo, cuando los estudios fueron repetidos con silicona se observaron ligeras variaciones (5 %, 7% y 10 %). El grupo también revisó una presentación de una nueva hipótesis que sugiere que el estado sólido de la carcinogénesis puede estar relacionado con una interferencia de la comunicación o brecha en la unión intercelular causada por las interacciones de las células y el material (37). El grupo consideró que esta teoría tenía aspectos promisorios pero además consideró que su relevancia hacia el riesgo carcinogénico humano aún es ambiguo.

Durante la discusión los representante de los cuerpos regulatorios Europeos, Japoneses y de Estados Unidos no acordaron una decisión unánime sobre el riesgo carcinogénico analizado sobre las bases del estado sólido de la carcinogénesis solamente. En los pocos ejemplos conocidos, donde las decisiones del riesgo de carcinogénesis fueron hechas utilizando los resultados del estado sólido de la carcinogénesis, existían datos que sustentaban esta teoría, como datos de mutagenicidad positivos.

La conducta de los estudios de carcinogenicidad mediante implantes requiere procedimientos quirúrgicos invasivos tanto en los animales a los que se les coloca el implante como a los que se les simula (controles). Por lo que existe un significativo costo en el cuidado y bienestar de los animales cuando es conducido un estudio con estas características. En consideraciones a la metodología para estudios de carcinogenicidad, mientras se garantiza la revisión de esta parte en la ISO 10993, el Grupo de Trabajo consideró que no podían establecer grandes requisitos en los estudios de carcinogenicidad para ser ejecutados mediante la implantación por la presente ambigüedad con respecto al riesgo humano. La racionalidad que la sustenta fue la ausencia de un claro papel de estos estudios de implantación en decisiones que afectan la evaluación de la seguridad biológica, así como el marcado costo respecto al cuidado y bienestar animal.

Sin embargo, si la ejecución de estudios de carcinogenicidad se creen necesarios (ver 5.4.1), el método presentado en C.3 puede ayudar en la interpretación de estudios de carcinogenicidad llevados a cabo mediante implantación. Si tales estudios son ejecutados, la necesidad del diseño del estudio debería estar justificada y su papel en la evaluación de los riesgos humanos bien descritos.

### **C.3 Estudios de carcinogenicidad llevados a cabo como ensayos de implantación**

Si este procedimiento opcional es llevado a cabo, el siguiente protocolo deberá ser seguido de la siguiente forma:

Mientras que un único grupo de dosis máxima implantable (DMI) puede ser suficiente, son recomendados dos grupos de dosis incluyendo el DMI y una fracción de este (usualmente la mitad de la DMI). El grupo control negativo puede generalmente recibir un material clínicamente comparable en la forma o un material de control o referencia que no posea potencial carcinogénico bien documentado como por ejemplo materiales de polietileno.

En ensayos de carcinogenicidad en roedores, deberá ser aplicado el DMI de un material o de un equipo médico. Si es posible, estas dosis deberán ser expresadas como un múltiplo del peor caso de exposición humana, en miligramos por kilogramos.

La masa y/o el área de superficie que determina la dosis del implante deberá exceder la exposición clínica esperada. La racionalidad para la selección de la dosis deberá estar bien documentada. Cuando sea apropiado, un implante satisfactorio formado de acuerdo con la ISO 10993-6 debe ser realizado para el (los) material(es) a ensayar, con apropiadas consideraciones siendo dada para la posibilidad de inducir una carcinogénesis del estado sólido (Efecto de Oppenheimer, ver bibliografía para los ensayos de genotoxicidad y carcinogenicidad (31)).

## BIBLIOGRAFIA

### Bibliografía General

1. OECD 474 Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos.
2. OECD 475 Ensayo de aberraciones cromosómicas en la médula ósea de los mamíferos.
3. OECD 478 Toxicología genética: Ensayo de mutación letal dominante en roedores.
4. OECD 479 Toxicología genética: Ensayo in vitro de intercambio de cromátidas hermanas en células de mamíferos.
5. OECD 480 Toxicología genética: Ensayo de mutación génica. *Saccharomyces cerevisiae*.
6. OECD 481 Toxicología genética: Ensayo de recombinación mitótica. *Saccharomyces cerevisiae*.
7. OECD 482 Toxicología genética: Daño al ADN y reparación in vitro, síntesis no esquemática en células de mamífero.
8. OECD 483 Toxicología genética: Ensayo de aberraciones cromosómicas de las células espermatogoniales de mamíferos.
9. OECD 484 Toxicología genética: Ensayo del Ratón "in situ". Spot test.
10. OECD 485 Toxicología genética: Ensayo de translocación hereditaria en el ratón.
11. OECD 486 síntesis no esquemática de ADN (UDS). Ensayo in vivo con células hepáticas de mamífero.
12. Oficial Journal of the European Communities, L 133/73, May 1988, concerning in vitro cell transformation test.

### Literatura sobre animales transgénicos

13. Gorelick, NJ. Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1995, 25, pp. 218-230
14. Provost, GS, Rogers BJ, Dyaico MJ and Carr G. Evaluation of the transgenic Lambda/LacI mouse models as a short-term predictor of heritable risk. *Mutation Research*, 1997, 388, pp. 129-136
15. Krishna G, Urda G and Theiss J. Principles and practice of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1998, 32, pp. 115-120
16. McGregor JT. Transgenic animals models for mutagenesis studies: role in mutagenesis research and regulatory testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1998, 32, pp. 106-109.

17. Kohler, SW. et al. Development of a short-term in vivo mutagenesis assay: the effect of methylation on the recovery of a lambda phage shuttle vector from transgenic mice. *Nucleic Acid Research*. 1990, vol. 18, p.3007-13.
18. Short, JM., Kohler, SW. y Provost, GS. The use of lambda phage shuttle vectors in transgenic mice for development of a short term mutagenicity assay. *Mutation and the environment*. Wiley-liss: New York, 1990. p 355-67.

#### **Literatura sobre los ensayos de transformación celular**

19. Leboeuf RA, Kerckaert KA, Aadema MJ and Isfort RJ. Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. IARC Science Publications, 1999, 146, pp. 409-425
20. Leboeuf RA et al. The pH 6.7 hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Mutations Research*, 1996, 356, pp. 65-84
21. Aadema MJ, Isfort R, Thompson ED and Leboeuf RA. The low pH Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay: a revitalized role in carcinogenic prediction. *Mutation Research*. 1996, 356, pp. 5-9
22. Isfort RJ, and Leboeuf RA. The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system: a biologically relevant in vitro model – with carcinogen predicting capabilities - of in vivo multistage neoplastic transformation. *Critical Reviews in Oncology*, 1995, 6, pp. 251-260
23. *Advances in Modern Environmental toxicology Vol1. Mammalian Cell Transformation by Chemical Carcinogens*. N. Mirshra, V. Dunkel y M. Mehlman (eds) Senate Press: Princeton Junction (New Jersey, 08550), 1981.
24. *Transformation Assay of Stablished Cell Lines: Mechanism and Application*. T. Kakunaga y H. Yamasaki (eds). Proceedings of a Workshop organised by IARC in collaboration with the US National Cancer Institute and the US Environmental Protection Agency, Lyon 15-17 of February. 1984. Scientific Publication IARC No. 67.
25. Barret JC, Ohshimura, M, Tanaka, N and Tsutsui, T. Genetic and Epigenetic Mechanisms of Presumed Nongenotoxic Carcinogens. *Bambury Report 25: Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogénesis*, 1987, p. 311-324.
26. Ohsmimura, M., Hesterberg, TW., Tsutsui, T y Barre, JC. Correlation fo Asbestos-induced Cytogeneict Effects with Cell Trasformation of Syrian Hamster Embryo Cells in Culture. *Cancer Res*. Nov. 1984, vol. 44, p. 5017-22.
27. Barret, JC., Oshimura, M., Tanaka, N. y Tsutsui, T. Role of Aneuploidy in Earley and Late Stages of Neoplastion Progression of Syrian Hamster Embryo Cells in Culture. *Aneuploidy*. Wicki L. Dellargo, Peter E. Voytek y Alexander Hollaender (eds). Plenum Publishing, 1985.
28. Fitzgerald, DJ. and Yamasaki, H. Tumor promotion: models and assay systems. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.*, 1990, vol. 10, No. 2, p. 89-102.

29. Kuroki, T. and Matasushima, T. Performance of short-term test for detection of human carcinogens. *Mutagenesis*, 1987, vol. 2, No. 1, p. 33-7.
30. Ray, VA, et al. An approach to identifying specialized batteries of bioassays of specific classes of chemicals: class analysis using mutagenicity and carcinogenicity relationships and phylogenetic concordance and discordance patterns. 1. Composition and analysis of overall data base. A report of phase II of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 1987, vol. 3, p. 197-241.
31. Dunkel, VC. et al.. Interlaboratory evaluation on the C3H/10T1/2 cell transformation assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1988, vol. 12, No. 1, p. 21-31.
32. Jones, CA. et al. An interlaboratory evaluation of the Syrian hamster embryo cell transformation assay using eighteen coded chemicals. *Toxicology "in vitro"*, 1988, vol. 2, No. 2, p. 103-16.

#### **Literatura sobre ensayos de genotoxicidad y carcinogenicidad**

33. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 19, Some Monomers, Plastics and Synthetic Elastomers, and Acrolein, p. 41, 1979
34. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 74, Surgical Implants and Other Foreign Bodies, pp. 225-228, 1999
35. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 74, Surgical Implants and Other Foreign Bodies, pp. 282-297, 1999
36. Nakamura A et al., Difference in tumor incidence and other tissue response to polyetherurethanes and polydimethylsiloxane in long-term subcutaneous implantation into rats, *J Biomed Mater Res.*, 1992, 26, pp. 631-650
37. Tsuchiva T and Nakamura A. A new hypothesis of tumorigenesis induced by biomaterials: Inhibitory potentials of intercellular communication play an important role on the tumor-promotion stage, *J Long-term Effects Med. Implants*, 1995, 5, pp. 232-242
38. Department of Health. Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. Londres: HMSO, 1989 (Report on Health and Social Security Subject No. 35)
39. Department of Health. Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. Londres: HMSO, 1992 (Report on Health and Social Security Subject No. 42)
40. Oppenheimer, BS, Oppenheimer, ET. and Stout, AP. Sarcomas induced in rats by implanting cellophane. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, vol. 67, No. 33.
41. Brand, KG., Johnson, KH and Bucen, LC. Foreign Body, Tumorigenesis *CRC Crit. Rev. Toxicology*, October 1976, p. 353.
42. Brand, L. And Brand, KG. Testing of implant Materials for Foreign Body Carcinogenesis. *Biomaterials*, 1980, p. 819. G.D. Winter, D.F. Gibbons, H. Plenk Jr. (eds) *Advances in Biomaterials*, vol. 3 New York: J. Wiley, 1982.

43. Biological Bases for Intraspecies Extrapolation of Carcinogenicity Data. Hill TA., Wands, RC., Leukroth RW. Jr. (eds). (Prepared for the Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Washington, DC.) July 1986, Bethesda (MD): Life Science Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology.
44. National Toxicology Program Report of the BTP Ad Hoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation, August 1984, Board of Scientific Counselors.
45. ASTM F 1439-39 Standard guide for performance of lifetime bioassay for the tumorigenic potential of implants materials
46. Carere A et al. Methods and testing strategies for evaluating the genotoxicity properties of chemicals, European Commission Report EUR 15945 EN, ISSN 1018-5593, Luxembourg (1995)
47. Foran JA (ed.), Principles for the selection of doses in chronic rodent bioassays, ILSI Risk Science Institute, Washington DC, USA, ISBN 0.944398-5, 1997

#### **Literatura sobre los ensayos sobre la toxicidad sobre la capacidad reproductora**

48. Guideline for toxicity studies of drugs, Chapter 4: Reproductive and developmental toxicity studies. First edition. Editorial Supervisión by New Drugs Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Yakuji Nippo Ltd. 21.
49. Gabrielson, JL and Larsson, KS. Proposals for improving risk assessment in reproductive toxicology. *Pharmacology & Toxicology*, 1990, vol. 66, p. 10-17.
50. Neubert, D. et al. Results of in vivo and in vitro Studies for Assessing Technique for Teratogens ? Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 1982, 2, pp. 243-253.
51. Sadler, TW., Horton, WE and Warner, CW. Whole Embryo Culture: A Screening Technique for Teratogens ? Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 1982, vol. 2, p. 243-253.
52. In Vitro Methods in Developmental Toxicology: Use in Defining Mechanisms and Risk Parameters. GL Kimmel and DM. Kochnar (eds.). Boca Raton (Florida): CRC Press, 1990
53. In Vitro Embriotoxicity and Teratogenicity Tests. Homburger and AH. Golberg (eds) Concepts in Toxicology, vol. 3. Basel: Karger, 1985.
54. Brent, RL. Predicting Teratogenic and reproductive Risks in Human from Exposure to Various Environmental Agents Using "In vitro" Techniques and "In vivo" Animal Studies. *Cong. Anom.*, 1988, vol. 28 (Suppl), S41-55.
55. Tsuchiya, T., Nakamura, T., Lio, T. y Takahasi, A. Species Differences between Rats and Mice in the Teratogenic action of Ethylenethiourea: "In vivo/In vitro" Tests and Teratogenic of Sera Using an Embryonic Cell Differentiation System. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991, vol. 109, p. 1-6.

56. Tsuchiya, T., et al. Embryo lethality of new herbicides is not detected by the micromass teratogen test. *Arch. Toxicol.*, 1991, vol. 65, p. 145-49.
57. Kistler, A., Tsuchiya, T., Tsuchiya, M., and Klaus, M. Teratogenicity of retinoids (retinoids) in vivo and in vitro. *Arch. Toxicol.*, 1990, vol. 64, p. 616-22.
58. Tsuchiya, T., et al. Comparative Studies of Embriotoxic Action of Ethylenethiourea in Rat Whole Embryo and Embryonic Cell Culture. *Teratology*, 1991, vol. 43, p. 319-24.
59. Report of in vitro teratology task force, Organized by the Division of Toxicology, Office of Toxicological Sciences, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration. *Environmental Health Perspective*, 1987, vol. 72, p. 200-35.
60. Bass, R., et al. Draft guideline on detection of toxicity to reproduction for medical products. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.*, 1991, vol. 9, No. 3, p. 127-41.
61. Brown et al. Screening chemicals for reproductive toxicity: the current approaches –Report and recommendations of an ECVAM/EST workshop (ECVAM Workshop 12), *ATLA*, 1995, 23, pp. 868-882
62. Spielman H, Reproduction and development, *Environmental Health Perspective*, 106 (Suppl 2), 1998, pp. 571-76.

#### **Bibliografía para ensayos con animales transgénicos como alternativas para ensayos largos de carcinogenicidad**

63. Gulezian D et al. Use of transgenic animals for carcinogenicity testing: considerations and implications for risk assessment. *Toxicol. Pathol.* 2000, 28, pp. 482-99
64. Storer RD. Current status and use of short/medium term models for carcinogenicity testing of pharmaceuticals – Scientific perspective. *Toxicol. Lett.*, 2000, 112-113, pp.557-566
65. Dass SB, Bucci TJ, Heflich RH and Casciano DA. Evaluation of the transgenic p53+/- mouse for detecting genotoxic liver carcinogens in a short-term bioassay. *Cancer Lett.*, 1999, 143, pp. 81-85
66. Tennant RW et al. Genetically altered mouse models for identifying carcinogens. *IARC Science Publications*, 1999, 146, pp. 123-150
67. Mahler JF et al. Spontaneous and chemically induced proliferative lesions in TG.AC transgenic and p53-heterozygous mice. *Toxicol. Pathol.*, 1998, 26, pp. 501-511