
NORMA CUBANA

NC

ISO 10993-11: 2010
(Publicada por la ISO en 2006)

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS
— PARTE 11: ENSAYOS DE TOXICIDAD SISTÉMICA
(ISO 10993-11:2006, IDT)**

Biological evaluation of medical devices — Part 11: Tests for systemic toxicity

ICS: 11.040

1. Edición Mayo 2010
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) 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



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 10993-11: 2010

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 11 de Equipos Médicos integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Centro de Biomateriales
 - Centro de Control Estatal de Equipos Médicos
 - Centro Nacional de Electromedicina
 - Centro Nacional de Ensayos Clínicos
 - Centro Nacional de Investigaciones Científicas
 - Centro para el Control Estatal de la Calidad de Medicamentos
 - Comisión Asesora de Equipos Médicos
 - Complejo Ortopédico "Frank País"
 - Grupo Nacional de Anestesiología
 - Grupo Nacional de Estomatología
 - Instituto Central de Investigación Digital
 - Instituto Nacional de Investigaciones en Metrología
 - Instituto de Investigaciones en Normalización
 - Instituto de Oncología y Radiobiología
 - MEDICUBA
 - Ministerio de la Informática y las Comunicaciones
 - Oficina Nacional de Normalización
 - Red Funcional de Implantología
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 10993-11: 2006 Biological evaluation of medical devices. Part 11: Tests for systemic toxicity.
- Sustituye a la NC-ISO 10993-11: 2003 Evaluación biológica de equipos médicos. Parte 11: Ensayos de toxicidad sistemática.
- Comprende varios Anexos informativos.

© NC, 2010

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

0	Introducción	5
1	Objeto y campo de aplicación	6
2	Normas para consulta	6
3	Términos y definiciones	6
4	Consideraciones generales	7
4.1	Generalidades	7
4.2	Selección de especies animales	8
4.3	Estado de los animales	8
4.4	Cuidado y manejo de los animales	8
4.5	Tamaño y número de los grupos	9
4.6	Ruta de exposición	10
4.7	Preparación de la muestra	10
4.8	Dosificación	10
4.9	Peso corporal y consumo de comida/agua	11
4.10	Observaciones clínicas	12
4.11	Patología clínica	12
4.12	Estudio anatomopatológico	12
4.14	Calidad de la investigación	13
5	Toxicidad sistémica aguda	13
5.1	Generalidades	13
5.2	Diseño del estudio	14
5.3	Criterios de evaluación	16

6 Toxicidad sistémica a la exposición repetida (toxicidad sistémica subaguda, subcrónica y crónica).....	18
6.1 Generalidades	18
6.2 Diseño del estudio	19
6.3 Criterios de evaluación	22
6.4 Informe final.....	22
Anexo a(informativo)rutas de administración.....	23
Anexo b(informativo)volúmenes de dosificación	25
Anexo c(informativo)señales y observaciones clínicas comunes	26
Anexo d(informativo)mediciones hematológicas, de química clínica, y de análisis de orina recomendadas	27
Anexo e(informativo)listado de órganos recomendados para evaluación histopatológica....	29
Anexo f(informativo) información sobre pirógenos mediados por materiales	31
Bibliografía.....	33

0 Introducción

La toxicidad sistémica es un efecto adverso potencial de la utilización de equipos médicos. Efectos generalizados, así como efectos sobre órganos y sistemas de órganos se pueden deber a la absorción, distribución y metabolismo de los lixiviados del producto o de sus materiales en partes del cuerpo con las que no están en contacto directo. Esta parte de la Norma NC ISO 10993 aborda la evaluación de la toxicidad sistémica generalizada, no la toxicidad de ningún órgano o sistema de un órgano diana específico, aunque estos efectos pueden ser debidos a la absorción y distribución sistémica de agentes tóxicos.

Debido al amplio espectro de equipos médicos, y sus materiales y utilizaciones previstas, esta parte de la Norma NC-ISO 10993 no es ampliamente prescriptiva. Si bien contempla aspectos metodológicos específicos a considerar en el diseño de los ensayos de toxicidad sistémica, el diseño del estudio apropiado se debe adecuar a la naturaleza de los materiales del producto y a su aplicación clínica prevista.

Otros elementos de esta parte de la Norma NC- ISO 10993 son de naturaleza prescriptiva, incluyendo aquellos aspectos que contemplan la conformidad con las buenas prácticas de laboratorio y los elementos para inclusión en los informes del ensayo.

Si bien algunos ensayos de toxicidad sistémica (por ejemplo, estudios de implantación a largo plazo o de toxicidad dérmica) se pueden diseñar para estudiar efectos sistémicos y efectos locales, carcinogénicos o que afectan al sistema reproductor, este documento enfoca solamente aquellos aspectos de tales estudios previstos para contemplar efectos sistémicos. Los estudios previstos para contemplar otros puntos finales toxicológicos se tratan en las Normas Nacionales NC- ISO 10993-3, NC-ISO 10993-6, NC- ISO 10993-10 e ISO/TS 10993-20.

La pirogenicidad (véase el anexo F) representa un efecto sistémico adicional que se ha incluido históricamente en esta parte de la Norma NC- ISO 10993. Sin embargo, se están haciendo esfuerzos por la ISO para contemplar la pirogenicidad en una norma individual.

Finalmente, la toxicología es una ciencia imperfecta. El resultado de un solo ensayo individual no debería ser el único fundamento para hacer una determinación de si un producto es seguro para su utilización prevista.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS — PARTE 11: ENSAYOS DE TOXICIDAD SISTÉMICA

1 Objeto y Campo de Aplicación

Esta parte de la Norma NC-ISO 10993 especifica los requisitos y aporta recomendaciones sobre los procedimientos a seguir en la evaluación del potencial de los materiales de equipos médicos para causar reacciones sistémicas adversas.

2 Normas para Consulta

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de ésta).

ISO 10993-1 Evaluación biológica de equipos médicos — Parte 1: Evaluación y ensayos.

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

ISO 10993-12 Evaluación biológica de equipos médicos. Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.

3 Términos y Definiciones

A efectos de este documento, son aplicables los términos y definiciones dados en la Norma NC-ISO 10993-1 y los siguientes:

3.1 Dosis-dosificación:

Cantidad de muestra de ensayo administrada (por ejemplo: masa, volumen) expresada por unidad de peso corporal o área superficial.

3.2 Dosis-efecto:

Relación entre la dosis y la magnitud de un efecto biológico definido ya sea en un individuo o en una muestra de la población.

3.3 Dosis-respuesta:

Relación entre la dosis y el espectro de efectos relacionados con la exposición.

NOTA Existen dos tipos de relaciones dosis-respuesta. El primero es la respuesta de un individuo a un espectro de dosis. El segundo es la distribución de respuestas de una población de individuos a un espectro de dosis.

3.4 Sustancia lixiviable:

Agente químico extraído de un producto o material por la acción del agua u otros líquidos relacionados con la utilización del producto.

NOTA Ejemplos de sustancias lixiviables son aditivos, residuos de agentes esterilizantes, residuos de procesos, productos de degradación, disolventes, plastificantes, lubricantes, catalizadores, estabilizadores, antioxidantes, agentes colorantes, materiales de aportación y monómeros.

3.5 Ensayo límite:

Utilización de un grupo único tratado con una dosis adecuada de la muestra de ensayo, para establecer la presencia o ausencia de un peligro tóxico.

3.6 Toxicidad sistémica:

Toxicidad que no está limitada a efectos adversos en el punto de contacto entre el cuerpo y el producto.

NOTA La toxicidad sistémica requiere la absorción y distribución de un agente tóxico desde su punto de entrada hasta un lugar alejado en el que se producen los efectos nocivos.

3.7 Toxicidad sistémica aguda:

Efectos adversos producidos en cualquier momento después de exposiciones individuales, múltiples o continuas de una muestra de ensayo antes de transcurridas 24 h.

3.8 Toxicidad sistémica subaguda:

Efectos adversos producidos después de exposición múltiple o continua entre 24 h y 28 días.

NOTA Dado que este término es semánticamente incorrecto, los efectos adversos que se producen antes de transcurrido el período de tiempo especificado se pueden también describir como un estudio de toxicidad sistémica con exposición repetida a corto plazo. La selección de intervalos de tiempo entre 14 días y 28 días es coherente con la mayoría de las recomendaciones reglamentarias internacionales y se considera un enfoque razonable. Los estudios intravenosos agudos se definen generalmente como duraciones de tratamiento > 24 h pero < 14 días.

3.9 Toxicidad sistémica subcrónica:

Efectos adversos producidos después de la administración repetida o continua de una muestra de ensayo para una parte del período de vida.

NOTA Los estudios de toxicidad subcrónica duran normalmente 90 días en roedores pero sin sobrepasar el 10% de la duración de vida de otras especies. Los estudios intravenosos subcrónicos se definen generalmente como duraciones de tratamiento comprendidas entre 14 días y 28 días.

3.10 Toxicidad sistémica crónica:

Efectos adversos producidos después de la administración repetida o continua de una muestra de ensayo para una parte grande del período de vida.

NOTA Los estudios de toxicidad crónica tienen normalmente una duración comprendida entre 6 meses y 12 meses.

3.11 Muestra de ensayo:

Material, producto, porción de producto, componente, extracto o porción del mismo que se somete a ensayo o evaluación química o biológica.

4 Consideraciones Generales**4.1 Generalidades**

La selección del (de los) ensayo(s) apropiado(s) para un producto debe cumplir la Norma Internacional ISO 10993-1, considerando debidamente el modelo y la duración del contacto.

El ensayo se debe efectuar utilizando el producto final y/o muestras de componentes representativas del producto y/o materiales finales. Las muestras de ensayo deben reflejar las condiciones en las que se fabrica y procesa normalmente el producto. Si son necesarias desviaciones, se deben registrar en

el informe del ensayo, junto con su justificación. A efectos de la identificación de peligros, puede ser necesario exagerar la exposición a las muestras de ensayo.

Las propiedades físicas y químicas de la muestra de ensayo, por ejemplo, pH, estabilidad, viscosidad, osmolalidad, capacidad tampón, solubilidad y esterilidad, son algunos factores a considerar cuando se diseña el estudio.

Cuando se consideran estudios con animales, para satisfacer los requisitos de la Norma Internacional ISO 10993-2, se deberían identificar y poner en práctica todas las alternativas de reemplazo, reducción y refinamiento que sean razonable y prácticamente disponibles. Para los ensayos de toxicidad aguda in vivo, los datos de citotoxicidad in vitro son útiles para estimar las dosis de partida^[9]

4.2 Selección de especies animales

No existe un criterio absoluto para seleccionar una especie animal particular para los ensayos de toxicidad sistémica de equipos médicos. Sin embargo, la especie utilizada se debe justificar científicamente y cumplir los requisitos de la Norma Internacional ISO 10993-2. Para los estudios orales, intravenosos, dérmicos y de inhalación agudos de equipos médicos se prefiere el ratón o la rata con la opción del conejo en el caso de estudios dérmicos y de implantación. Puede también ser preciso considerar especies de no roedores para los ensayos, reconociendo que un número de factores puede dictar el número o la elección de la especie para el estudio.

Se prefiere utilizar una única especie y cepa animal cuando se realiza una serie de estudios de toxicidad sistémica de diferentes duraciones, por ejemplo, toxicidad sistémica aguda, subaguda, subcrónica y/o crónica. Esto controla la variabilidad entre especies y cepas y facilita una evaluación relacionada solamente con la duración del estudio. Si se utilizan múltiples especies y cepas, se debe documentar la justificación de tal selección.

4.3 Estado de los animales

En general, se deberían utilizar animales adultos jóvenes y sanos, criados para tal fin, de origen conocido y con un estado de salud microbiológica definido. Al comienzo del estudio, la variación en el peso de los animales utilizados dentro de un mismo sexo no debería ser superior al $\pm 20\%$ del peso medio. Cuando se utilizan hembras, deberían ser nulíparas y no gestantes. La selección de los animales se debe justificar.

4.4 Cuidado y manejo de los animales

El cuidado y manejo de los animales debe cumplir las recomendaciones aceptadas para el tratamiento de los mismos. Los animales se deben aclimatar a las condiciones del laboratorio antes del tratamiento y se debe documentar tal período de tiempo. Son necesarios el control de las condiciones ambientales y las técnicas apropiadas de cuidado de los animales para obtener resultados significativos. Igualmente se debe garantizar que el personal vinculado directamente con el cuidado y manejo de los animales, estén entrenados y debidamente calificados, para disminuir el estrés durante la administración, garantizar la calidad en la toma de muestra y sobre todo ofrecerle un trato humano a los animales involucrados con el estudio. Se deberían caracterizar de forma apropiada los constituyentes dietarios y los materiales de las camas que se sabe producen o influyen la toxicidad y se debería tener en cuenta su potencial para influenciar los resultados de los ensayos.

4.5 Tamaño y número de los grupos

4.5.1 Tamaño de los grupos

La precisión del ensayo de toxicidad sistémica depende en gran medida del número de animales utilizados por nivel de dosis. El grado de precisión necesario, y a su vez, el número necesario de animales por grupo de dosis depende del propósito del estudio.

Los tamaños de los grupos deberían lógicamente aumentar con la duración del tratamiento, de forma que al final del estudio exista un número suficiente de animales en cada grupo para una evaluación biológica completa. Sin embargo, se debería utilizar el número mínimo de animales coherente con la obtención de resultados significativos (véase la NC/ISO 10993-2). Los tamaños de los grupos mínimos recomendados, consideradas todas las rutas, se dan en la tabla 1.

Tabla 1 — Tamaños de los grupos mínimos recomendados

Tipo de estudio	Roedor	No roedor
Agudo ^a	5	3
Subagudo	10 (5 por sexo) ^a	6 (3 por sexo) ^a
Subcrónico	20 (10 por sexo) ³	8 (4 por sexo) ^a
Crónico	40 (20 por sexo) ^{b>c}	C

a) Es aceptable el ensayo en un único sexo. Cuando un producto está previsto para utilización solamente en un sexo, el ensayo se debería hacer en tal sexo.

b) La recomendación se refiere a un ensayo del grupo de nivel de dosis. Cuando se incluyen grupos adicionales de dosis exageradas, el tamaño del grupo recomendado se puede reducir a 10 por sexo.

c) Se recomienda la consulta estadística de experto para el tamaño del grupo del estudio crónico. El número de animales ensayados debería estar basado en el mínimo requerido para proporcionar datos significativos. Deben permanecer suficientes animales al final del estudio para garantizar la evaluación estadística apropiada de los resultados.

4.5.2 Número de grupos

Un grupo de dosis tratado a una dosis adecuada de muestra de ensayo en una sola especie puede revelar la presencia o ausencia de un peligro tóxico (es decir, un ensayo límite). Sin embargo, otros estudios multi-dosis o dosis-respuesta requieren múltiples grupos para revelar la respuesta tóxica.

Los números de grupos pueden aumentar cuando se intenta exagerar la dosis, se deberían considerar los ejemplos siguientes para la exageración de la dosis:

- múltiplos del área superficial clínica de exposición;
- múltiplos de la duración de exposición;
- múltiplos de la fracción extraíble o de los productos químicos individuales;
- administraciones múltiples dentro de un período de 24 h.

Pueden ser aceptables otros métodos para exagerar la dosis. Se debe justificar el método utilizado.

4.5.3 Controles del tratamiento

Dependiendo del objetivo del estudio, la naturaleza del artículo de ensayo y la ruta de exposición, se deberían incorporar controles negativos, vehículo y/o controles de simulación en todos los estudios de toxicidad sistémica. Estos controles deben simular la preparación de la muestra de ensayo y el procedimiento de tratamiento.

4.6 Ruta de exposición

Los equipos médicos o sus sustancias lixiviables pueden acceder al cuerpo a través de múltiples rutas de exposición. La ruta de ensayo debe ser la más clínicamente relevante a la utilización del producto, cuando sea posible. Si es necesaria una ruta alternativa de exposición, tal ruta se debe justificar. Ejemplos de rutas de administración se pueden encontrar en el anexo A.

4.7 Preparación de la muestra

Las recomendaciones para la preparación de la muestra se dan en la Norma Internacional ISO 10993-12.

4.8 Dosificación

4.8.1 Administración de la muestra de ensayo

Se deberían diseñar procedimientos para evitar cambios fisiológicos o problemas de bienestar de los animales no directamente relacionados con la toxicidad del material de ensayo. Si una única dosis diaria de un volumen o concentración suficiente no es posible, la dosis se puede administrar en fracciones más pequeñas durante un período no superior a 24 h.

Las muestras de ensayo se deben administrar a una temperatura fisiológicamente aceptable. En general, la temperatura ambiente o corporal es una práctica común. Las desviaciones se deben justificar.

Los vehículos administrados por una ruta parenteral deberían ser fisiológicamente compatibles. Cuando sea necesario, se debería utilizar y documentar la filtración de la muestra para retener las partículas.

La restricción de los animales en estudios de toxicidad sistémica con exposición repetida se debería generalmente limitar a períodos entre 4 h y 6 h por día. La naturaleza y duración de la restricción deberían ser las mínimas precisas para cumplir los objetivos científicos y no deberían en sí mismas comprometer el bienestar de los animales de ensayo. Las desviaciones se deben justificar.

Cuando se requiere la restricción, los animales se deberían aclimatar al dispositivo de restricción antes de la administración de la muestra de ensayo.

4.8.2 Volúmenes de dosis

Las recomendaciones sobre el volumen de la dosis se resumen en el anexo B. Cuando se utilizan grupos múltiples de dosis, la variabilidad en el volumen de ensayo se puede reducir al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante para todas las dosis. Se debe justificar la utilización de volúmenes de dosis mayores que aquéllos dados en el anexo B.

Se deberían evitar volúmenes grandes de dosis por la ruta oral porque se ha demostrado que sobrecargan la capacidad del estómago y pasan inmediatamente al intestino delgado. Los volúmenes grandes pueden también refluir al esófago.

La administración intramuscular es también limitada en volumen, dependiendo del tamaño del animal y del lugar muscular. Los volúmenes de administración intramuscular específicos para cada especie se contemplan en el anexo B.

Los volúmenes de inyección de bolo intravenoso se administran normalmente durante un período corto de aproximadamente 1 min. La velocidad de inyección es un factor importante y se recomienda que para roedores, la velocidad no debe ser superior a 2 ml/min

La inyección lenta o cronometrada, o la infusión intravenosa se pueden precisar para la administración de volúmenes grandes. Sea cual fuere la velocidad calculada, la velocidad de administración de fluido se debe detener o disminuir si el animal demuestra un cambio pronunciado en su condición clínica.

Pueden ser necesarias velocidades lentas de inyección intravenosa para muestras de ensayo limitadas por su solubilidad o poder irritante.

Se puede utilizar infusión continua si está clínicamente indicado. El volumen y la velocidad de administración dependerán de la sustancia que se va a administrar y se tendrá en cuenta la práctica normal de terapia de fluidos. Como recomendación, el volumen administrado en una sola ocasión será < 10% del volumen de sangre circulante durante 2 h. La restricción efectiva mínima de los animales de ensayo es un factor clave a considerar para la infusión prolongada.

Para la administración subcutánea del artículo de ensayo, consúltese el anexo B. La velocidad y el alcance de la absorción dependen de la formulación de la muestra de ensayo.

4.8.3 Frecuencia de dosificación

La frecuencia de dosificación se debería basar en la relevancia clínica. Los procedimientos exagerados se deben describir y justificar claramente.

En los estudios de toxicidad sistémica aguda, los animales se deberían exponer a la muestra de ensayo en una única dosis o con fracciones múltiples de las dosis administradas dentro de un período de 24 h.

En los estudios de exposición repetida, se debería administrar a los animales la muestra de ensayo diariamente, siete días cada semana durante todo el ensayo. Pueden ser aceptables otros regímenes de dosificación, pero se deben justificar.

4.9 Peso corporal y consumo de comida/agua

El cambio de peso corporal y los cambios en el consumo de comida y agua se pueden atribuir a los efectos de un artículo de ensayo. En consecuencia, los pesos individuales de los animales se deben determinar poco tiempo antes de que se administre la muestra de ensayo (por ejemplo, normalmente durante las 24 h anteriores para dosis únicas o agudas, y no más tarde de 7 días para estudios de exposición repetida), a intervalos regulares durante el estudio y a la terminación del mismo. Cuando se apliquen las dosis según el peso corporal, se debería utilizar el peso corporal más reciente.

Para los estudios de exposición repetida a más largo plazo, se deben considerar las mediciones del consumo de comida y agua, según proceda.

4.10 Observaciones clínicas

Las observaciones clínicas se deberían efectuar por individuos entrenados para garantizar la cumplimentación del informe de forma coherente. La frecuencia y duración de la observación se deberían determinar por la naturaleza y severidad de las reacciones tóxicas, la velocidad de aparición de los síntomas y el período de recuperación. Puede ser necesaria una mayor frecuencia de observación en la fase precoz de un estudio, especialmente para estudios agudos. El momento en el que aparecen y desaparecen las señales de toxicidad, su duración y el momento de la muerte son importantes, especialmente si existe una tendencia de aparición con retraso de señales clínicas adversas o muertes. Se deberían utilizar puntos finales humanitarios para evitar el sufrimiento innecesario. Las observaciones clínicas generales deben considerar el período de cresta de los efectos anticipados después de la dosificación.

Las observaciones se deben registrar de forma sistemática conforme se hacen. Se deben mantener los registros para cada animal.

Las observaciones al pie de jaula para la viabilidad o indicios clínicos patentes se deben registrar al menos una vez cada día utilizando descriptores comunes de laboratorio para efectos clínicos (véase el anexo C).

Las observaciones de morbilidad y mortalidad se deben registrar al menos dos veces cada día para estudios de exposición repetida a largo plazo. Se puede considerar una selección más extensiva para los indicios clínicos adversos al menos una vez cada semana para estudios de exposición repetida a más largo plazo.

4.11 Patología clínica

Se realizan análisis hematológicos y de química clínica para investigar los efectos tóxicos en tejidos, órganos y otros sistemas. Cuando están indicados, estos análisis se deben efectuar utilizando muestras de sangre obtenidas a partir de animales de estudio de exposición repetida al menos justo antes, o como una parte del procedimiento para la terminación programada del animal.

El ayuno de los animales antes del muestreo de sangre puede ser necesario en algunos casos. Cuando esté científicamente indicado, el análisis de orina se puede efectuar durante la última semana de estudio de exposición repetida a largo plazo utilizando recogida de volúmenes de orina cronometrados (por ejemplo, 16h a 24h).

Los parámetros hematológicos, de química clínica y de análisis de orina recomendados para su evaluación se enumeran en el anexo D.

4.12 Estudio anatomopatológico

Cuando esté clínicamente indicado, se deberían considerar las evaluaciones patológicas gruesas para estudios de toxicidad sistémica aguda.

Todos los animales en estudios de exposición repetida se deben someter a una necropsia gruesa total y detallada que incluya el examen cuidadoso de la superficie exterior del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Los órganos seleccionados para pesarse se deberían recortar de cualquier tejido adherente, según proceda, y su peso húmedo se debe registrar tan pronto como sea posible para evitar la desecación.

El anexo E recomienda los tejidos que se deberían pesar y preservar en un medio de fijación apropiado para el examen histopatológico.

Un resumen de las observaciones mínimas para cada tipo de estudio se da en la tabla 2.

Tabla 2 — Resumen de las observaciones

Observación	Agudas	Subagudas	Subcrónicas/crónicas ^a
Cambio del peso corporal	+	+	+
Observaciones clínicas	+	+	+
Patología clínica	b	a, b	+
Patología gruesa	b	+	+
Pesos de los órganos	b	+	+
Histopatología	b	a, b	+

a) El ensayo de toxicidad sistémica crónica es generalmente una extensión temporal del ensayo subcrónico, justificado por el período de exposición humano. Se registran e incluyen en el informe muchos de los mismos parámetros. Los tamaños de los grupos se pueden aumentar para incluir grupos satélite, para los que se pueden hacer algunas o todas estas observaciones.

b) Se deberían considerar estas mediciones cuando están clínicamente indicadas o si no se anticipan ensayos de exposición más larga. En los anexos D y E se incluyen listas de los análisis de órganos/tejidos sanguíneos recomendados.

4.13 Diseños de los estudios

El diseño de los estudios se enumera en las secciones subsiguientes de esta parte de la NC/ISO 10993. Se recomienda la consulta de experto para el diseño de los estudios.

4.14 Calidad de la investigación

Las buenas prácticas de laboratorio versan sobre la organización, procesos y condiciones en las que se planifican, efectúan, realizan un seguimiento, registran y recogen en un informe los estudios de laboratorio. Estas prácticas están previstas para promover la calidad y validez de los datos de ensayo. También dan apoyo al esfuerzo de armonización global facilitando los memoranda de comprensión entre naciones que comercian entre sí. Los estudios de toxicidad sistémica se deben efectuar siguiendo tales principios.

5 Toxicidad Sistémica Aguda

5.1 Generalidades

La toxicidad sistémica aguda proporciona información general sobre los peligros para la salud que es probable surjan de una exposición aguda por la ruta clínica prevista. Un estudio de toxicidad aguda puede ser una etapa inicial que establece un régimen de dosificación en estudios subagudos/subcrónicos u otros estudios, y puede proporcionar información sobre el modo de la acción tóxica de una sustancia por la ruta de exposición clínica prevista.

Subsiguiente a la administración de la muestra de ensayo en los ensayos de toxicidad sistémica aguda, se hacen las observaciones de los efectos (por ejemplo, indicios clínicos adversos, cambio en el peso corporal, averiguaciones patológicas gruesas) y muertes. Los animales que muestran indicios

de angustia y dolor severos y duraderos precisan ser sometidos a eutanasia de forma inmediata. Los materiales corrosivos o irritantes que se sabe causan dolor o angustia marcados, se deberían notificar como tales y no precisan ser ensayados.

NOTA Las ICCVAM y ECVAM están actualmente validando ensayos de citotoxicidad in vitro como una alternativa a los ensayos de toxicidad aguda.

5.2 Diseño del estudio

5.2.1 Preparaciones

Se aclimatan animales adultos jóvenes y sanos a las condiciones del laboratorio durante al menos 5 días antes del ensayo. Las duraciones menores se deben justificar. Los animales se aleatorizan y asignan a los grupos de tratamiento.

5.2.2 Animales experimentales

5.2.2.1 Selección de las especies

Típicamente, se utiliza una especie de roedor (rata, ratón). Las características del modelo (edad, peso, etc.) son las descritas en el apartado 4.2 y 4.3. Si se utilizan especies que no son roedores, su utilización se debe justificar científicamente.

5.2.2.2 Número y sexo

El número y tipo de grupo, animales por grupo, y sexo se describen en el apartado 4.5.

5.2.2.3 Condiciones de alojamiento y alimentación

La temperatura y la humedad relativa en las salas que alojan a los animales experimentales deberían ser apropiadas para la especie, por ejemplo (22 ± 3)°C y 30% al 70% de HR para ratones. Típicamente, la secuencia de iluminación artificial debería ser 12 h luz, 12 h oscuridad.

Para la alimentación, se pueden utilizar dietas de laboratorio comercial normalizadas con un suministro ilimitado de agua de bebida. Los animales deberían estar enjaulados en grupos por sexo o individualmente, según proceda; para alojamiento en grupos no se deben alojar más de cinco animales por jaula.

5.2.3 Condiciones de ensayo

5.2.3.1 Niveles de dosis

Los niveles de dosis deben ser los descritos en el apartado 4.8.

Los animales en el grupo de control se deben manipular de idéntica forma que los sujetos del grupo de ensayo con la excepción de que no se les aplica la muestra de ensayo.

5.2.3.2 Procedimiento

Los animales reciben una única dosis de la muestra de ensayo, o cuando es necesario, dosis múltiples durante un único período de 24 h. Las señales de toxicidad se deberían registrar según se observan incluyendo el momento del comienzo, grado y duración de las mismas.

La observación regular de los animales es necesaria para asegurar que no se pierden para el estudio debido a canibalismo, autólisis de tejidos o por su colocación incorrecta. Al final del estudio, todos los animales supervivientes se someten a eutanasia. Cualquier animal moribundo se debería retirar y someter a eutanasia cuando se detecte que exhibe tal comportamiento.

Los programas de observación y los puntos finales humanitarios aplicados deberían evitar la posibilidad de que se encuentren animales muertos como una consecuencia directa de la toxicidad de la muestra de ensayo.

5.2.4 Pesos corporales

Las mediciones del peso corporal se deberían hacer inmediatamente antes de la dosificación, diariamente para los tres primeros días después de la dosificación, semanalmente después de la primera dosis si así lo indica la duración del estudio, y al final del estudio.

5.2.5 Observaciones clínicas

El período de observación para un estudio de toxicidad sistémica aguda debe ser al menos 3 días, o superior cuando se estime apropiado. Las características específicas de frecuencia y tipo de observación se describen en el apartado 4.10 y en el anexo C.

En todos los casos, las observaciones se deben hacer con una frecuencia dada, y se deben emprender acciones apropiadas para reducir al mínimo la pérdida de animales para el estudio, por ejemplo, necropsia o refrigeración de aquellos animales encontrados muertos y aislamiento o sacrificio de animales débiles o moribundos. Las observaciones a pie de jaula deberían incluir, entre otras, cambios de la piel y pelo, ojos y membranas mucosas, y también del sistema respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, actividad somatomotora y patrón de comportamiento, utilizando los descriptores proporcionados en el anexo C.

5.2.6 Patología

5.2.6.1 Patología clínica

Las evaluaciones de patología clínica se deben considerar cuando estén clínicamente indicadas. Se deberían hacer los exámenes siguientes:

- a) hematología, según se describe en el anexo D, se debería considerar para investigación al final del período de ensayo.
- b) determinación bioquímica clínica de la sangre, según se enumera en el anexo D, se debería considerar al final del período de ensayo. Las áreas de ensayo que se consideran apropiadas para los estudios de exposición aguda son las funciones hepática y renal. Se puede utilizar bioquímica clínica adicional cuando sea necesario para extender la observación de efectos detectados.

El análisis de orina no es necesario de forma rutinaria, sino solamente cuando exista una indicación basada en toxicidad esperada u observada. Los parámetros recomendados se enumeran en el anexo D.

5.2.6.2 Anatomía patológica

Las evaluaciones anatomopatológicas macroscópicas se deben considerar cuando estén clínicamente indicadas. Esto debería incluir un examen de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácica y abdominal junto con su contenido. Cuando proceda, se debería considerar registrar el peso del cerebro, hígado, riñones, cápsulas suprarrenales y

testículos, que se deberían pesar húmedos tan pronto como sea posible después de su disección para evitar su desecación y los valores falsamente bajos subsiguientes.

5.2.6.3 Histopatología

La histopatología completa no se efectúa como de costumbre en los órganos y tejidos de animales en estudios de toxicidad sistémica aguda, a menos que estén específicamente indicadas por indicaciones concretas de necropsia gruesa.

5.3 Criterios de evaluación

5.3.1 Generalidades

Dependiendo del diseño del estudio utilizado, son aplicables los criterios de evaluación siguientes:

a) Para ensayos tipo farmacológico

- Si durante el período de observación de un ensayo de toxicidad sistémica aguda ninguno de los animales tratados con la muestra de ensayo muestra una reactividad biológica significativamente mayor que la de los animales tratados con el control del vehículo, la muestra cumple los requisitos de este ensayo.
- Utilizando cinco animales, si dos o más animales mueren, o si ocurre comportamiento tal como convulsiones o postración en dos o más animales, o si se produce una pérdida de peso corporal superior al 10% en tres o más de los animales, la muestra no cumple los requisitos de este ensayo.
- Si cualquier animal tratado con la muestra exhibe solamente señales leves de reactividad biológica, y no más de un animal muestra síntomas marcados o severos de reactividad biológica o muere, se repite el ensayo utilizando grupos de diez animales.
- En el ensayo de repetición, si los diez animales tratados con la muestra no muestran reactividad biológica científicamente significativa por encima de la de los animales tratados con el control del vehículo durante el período de observación, la muestra cumple los requisitos de este ensayo.

b) Para ensayos de toxicidad sistémica aguda no farmacológica

Existe la opción de efectuar evaluaciones utilizando métodos más extensivos incluyendo patología clínica y anatómica, que puede eliminar la necesidad de realizar un ensayo repetido. La exposición aguda puede incluir una reevaluación si existen diferencias equívocas respecto a controles concurrentes. Las diferencias se deberían explicar y el estudio extender para incluir cinco animales adicionales, si procede.

5.3.2 Evaluación de los resultados

Las conclusiones de un estudio de toxicidad sistémica aguda se deberían evaluar junto con las conclusiones de estudios precedentes, si se encuentran disponibles, y se deberían considerar respecto a los efectos tóxicos y las conclusiones de necropsia, si se observan. La evaluación debe incluir la relación entre la dosis de la sustancia de ensayo y la presencia o ausencia y la incidencia y severidad de las anomalías, incluyendo anomalías de comportamiento y clínicas, lesiones severas, cambios en el peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto general o específico.

5.3.3 Informe final

El informe final para el estudio de toxicidad sistémica aguda debe contener, cuando proceda, la información siguiente:

- a) Sustancia de ensayo;
 - naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas, según proceda;
 - otros datos de identificación.

- b) Vehículo (si procede);
 - justificación de la elección del vehículo si es diferente al enumerado en la Norma Internacional ISO 10993-12

- c) Animales de ensayo;
 - especie/cepa utilizada;
 - número, edad y sexo de los animales;
 - fuente incluyendo el estado microbiológico (por ejemplo, barrera levantada, convencional),
 - condiciones de alojamiento (temperatura, humedad, cama, iluminación, dieta, etc.);
 - pesos al comienzo del ensayo.

- d) Condiciones del ensayo;
 - justificación de la selección de la dosis;
 - detalles de la sustancia, formulación/preparación de ensayo, concentraciones alcanzadas; estabilidad y homogeneidad, si procede;
 - detalles de la administración de la sustancia de ensayo;
 - conversión de la concentración de la sustancia de ensayo (ppm) a la dosis real (mg/kg peso corporal), si procede;
 - detalles de la comida, agua y calidad de la cama.

- e) Resultados:
 - los datos se pueden resumir en forma de tabla, mostrando para cada grupo de control y de ensayo el número de animales al comienzo del ensayo, el número de animales que muestran señales clínicas adversas, y el número de animales que muestran cambios de peso corporal;
 - peso corporal/ cambio de peso corporal;
 - consumo de comida y agua, si procede;
 - datos de la respuesta tóxica por sexo y nivel de dosis, incluyendo las señales de la toxicidad;
 - naturaleza, severidad y duración de las observaciones clínicas (si son reversibles o no);
 - evaluaciones neurológicas/de comportamiento, si procede;
 - ensayos hematológicos utilizados y resultados con datos basales relevantes, si procede;
 - ensayos de bioquímica clínica utilizados y resultados con datos basales relevantes, si procede;
 - ensayos de análisis de orina utilizados y resultados con datos basales relevantes, si procede;

- datos terminales del peso corporal y peso de los órganos, si procede;
- Hallazgos de la necropsia;
- descripción detallada de todas los hallazgos histopatológicos, si procede;
- evaluación estadística de los resultados y una discusión de su significación biológica.

- f) Discusión de los resultados.
- g) Conclusiones.
- h) Indicación de garantía de la calidad.

Un estudio de toxicidad sistémica aguda proporcionará información sobre los efectos de la exposición aguda a una sustancia de ensayo. La extrapolación de los resultados del estudio a seres humanos es válida hasta un grado limitado pero puede proporcionar información útil sobre la exposición permisible.

6 Toxicidad sistémica a la exposición repetida (toxicidad sistémica subaguda, subcrónica y crónica)

6.1 Generalidades

Mientras la toxicidad aguda trata de los efectos adversos de dosis únicas (o exposición limitada), una forma más común de exposición humana a muchos equipos médicos es en forma de exposiciones repetidas o continuas.

Los efectos de la exposición repetida o continua pueden ocurrir potencialmente debidos a la acumulación de agentes químicos en tejidos o por otros mecanismos, y es importante identificar cualquier potencial de tales efectos mediante ensayos a largo plazo (subagudos, subcrónicos, crónicos).

Los ensayos de toxicidad sistémica con exposición repetida proporcionan información sobre los peligros para la salud que es posible surjan de una exposición prolongada por la ruta clínica prevista. Pueden también proporcionar información sobre el modo de acción tóxica de una sustancia por la ruta de exposición clínica prevista.

Los estudios de toxicidad sistémica con exposición repetida proporcionarán información detallada sobre efectos tóxicos, órganos diana, reversibilidad u otros efectos y pueden servir de base para una estimación de la seguridad. Los resultados de estos estudios proporcionan información importante que se refleja en el alcance de la recomendación sobre las investigaciones de patología clínica y anatómica.

Los estudios de exposición repetida no proporcionan generalmente un criterio de reensayo. En vez de ello, los tamaños de los grupos se diseñan para acomodar una evaluación estadística de las observaciones registradas (véase la tabla 1).

Debido a las duraciones variables de los estudios de exposición repetida, las muestras de ensayo se deben preparar según se precisen para asegurar su estabilidad.

6.2 Diseño del estudio

6.2.1 Preparaciones

Se aclimatan animales adultos jóvenes sanos a las condiciones de laboratorio durante al menos 5 días antes del ensayo. Los animales se aleatorizan entonces y se asignan a los grupos de tratamiento.

6.2.2 Animales experimentales

6.2.2.1 Selección de especie

Se utilizan como de costumbre roedores (rata, ratón). Las características del modelo (edad, peso, etc.) se describen en los apartados 4.2 y 4.3. Cuando se utilizan especies que no son roedores se deben justificar científicamente.

6.2.2.2 Número y sexo

El número y tipo de grupos, animales por grupo, y sexo se describen en el apartado 4.5.1. Cuando esté científicamente justificado, se debe considerar la utilización de animales controles tratados con el nivel de dosis alto junto con controles para un período predeterminado más allá de la eutanasia terminal. Este grupo, con sus controles, se puede utilizar para examinar los efectos del tratamiento incluyendo la reversibilidad, persistencia o retraso en la aparición de efectos tóxicos. Para estudios subcrónicos los animales satélites se deben mantener durante no menos de 28 días.

6.2.2.3 Condiciones de alojamiento y alimentación

La temperatura y la humedad relativa en las salas de animales experimentales deberían ser apropiadas para la especie, por ejemplo, (22 ± 3) °C y 30% a 70% de humedad relativa para ratas. Como de costumbre, la secuencia de iluminación artificial debería ser 12 h de luz, 12 h de oscuridad.

Para la alimentación, se pueden utilizar dietas de laboratorio comerciales normalizadas con un suministro ilimitado de agua de bebida. Los animales pueden estar enjaulados en grupos según su sexo o individualmente, según proceda; para el alojamiento en grupos no se deberían alojar más de cinco animales por jaula.

6.2.3 Condiciones de ensayo

6.2.3.1 Niveles de dosis

El animal experimental y otras inversiones en recursos del estudio de toxicidad sistémica con exposición repetida, además del objetivo de establecer la seguridad en seres humanos, justifican la necesidad e utilizar grupos múltiples para examinar los efectos de la dosis-respuesta. Estos niveles deben estar descritos en el apartado 4.8.

La dosis a utilizar para ensayos de toxicidad de equipos médicos se debe definir en relación con los resultados del análisis de los riesgos, sopesando la dosis de exposición clínica con la utilización de factores de seguridad, según proceda. Para estudios de mayor duración, se deberían hacer esfuerzos para incluir al menos tres niveles de dosis y los controles apropiados. Excepto para tratamiento con la sustancia de ensayo, los animales en el grupo de control se deberían manipular de idéntica manera que los sujetos del grupo de ensayo.

A diferencia de los estudios químicos clásicos de toxicidad sistémica con exposición múltiple, los estudios de exposición repetida con equipos médicos no resultan a menudo en un efecto de dosis-respuesta, y por tanto no es obligatorio un efecto tóxico al nivel de dosis más alto. A pesar de ello, la utilización de una gama de dosis proporcionará una estimación útil del margen de seguridad en seres humanos.

6.2.3.2 Procedimiento

Los animales se dosifican con la muestra de ensayo idealmente con un régimen de 7 días/semana, durante el período de duración del estudio. Para estudios de exposición repetida a más largo plazo, es aceptable la dosificación de 5 días/semana aunque se debería documentar y justificar.

6.2.4 Pesos corporales

Las mediciones de peso corporal se deberían hacer inmediatamente antes de la dosificación, semanalmente después de la primera dosis si así lo indica la duración del estudio, y al final del estudio.

6.2.5 Observaciones clínicas

El período de observación para un estudio de toxicidad sistémica con dosis repetida debe ser apropiado para la duración del estudio. Los detalles específicos de la frecuencia y tipo de observaciones se describen en el apartado 4.10 y en el anexo C. En todos los casos, las observaciones se deben hacer con una frecuencia dada, y se deben emprender acciones apropiadas para reducir al mínimo la pérdida de animales para el estudio, por ejemplo, necropsia o refrigeración de aquellos animales encontrados muertos y aislamiento o eutanasia de animales débiles o moribundos.

Las observaciones a pie de jaula deberían incluir, entre otras, cambios en la piel y pelo, ojos y membranas mucosas, y también la actividad respiratoria, circulatoria, del sistema nervioso central y autonómico, y somatomotora y el patrón de comportamiento, utilizando los descriptores indicados en el anexo C.

Como de costumbre, los exámenes oftalmológicos se deberían hacer utilizando un oftalmoscopio o equipo adecuado equivalente, antes de la administración de la sustancia de ensayo y a la terminación del estudio, preferiblemente en todos los animales pero al menos en los grupos de dosis alta y de control. Si se detectan cambios en los ojos, se deberían examinar todos los animales. La excepción de efectuar el examen se debería documentar y justificar.

6.2.6 Patología

6.2.6.1 Patología clínica

Se deberían hacer los exámenes siguientes:

- a) Hematología, según se describe en el anexo C, se debería investigar al final del período de ensayo. Dependiendo de la longitud del estudio, se debería considerar una frecuencia superior de muestreo.
- b) Determinación bioquímica clínica de la sangre se debería considerar al final del período de ensayo. Dependiendo de la longitud del estudio, se debería considerar una frecuencia superior de muestreo. Las áreas de ensayo que se consideran apropiadas para todos los estudios de exposición repetida son el equilibrio de electrolitos, metabolismo de hidratos de carbono, y las funciones hepática y renal.

La selección de los ensayos específicos puede estar influenciada por las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia de ensayo. Las determinaciones recomendadas se enumeran en el anexo D. Se puede utilizar bioquímica clínica adicional cuando sea necesario para extender la observación de los efectos detectados.

El análisis de orina no es necesario de forma rutinaria, sino solamente cuando exista una indicación basada en toxicidad esperada u observada. Los parámetros recomendados se enumeran en el anexo D.

Los datos históricos para los valores normales son útiles para establecer los niveles basales y para comparación con los controles del estudio concurrentes. Si se estima que los datos basales históricos son inadecuados, se debería considerar la recogida de esta información para animales de la misma edad, sexo, cepa y origen, preferiblemente dentro del mismo laboratorio.

6.2.6.2 Patología gruesa

Todos los animales se deberían someter a una necropsia completa, que incluye el examen de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y la cavidad craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Las cápsulas suprarrenales, el cerebro, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, timo y útero se deberían pesar en húmedo tan pronto como sea posible después de la disección para evitar la desecación.

Los órganos seleccionados para ser pesados se deberían recortar de cualquier tejido adherente, según proceda, y su peso húmedo se debe registrar tan pronto como sea posible para evitar la desecación y los valores falsamente bajos subsiguientes. Los órganos y tejidos enumerados en el anexo E se deberían preservar en un medio adecuado para su futuro examen histopatológico.

6.2.6.3 Histopatología

- a) Se debería efectuar una histopatología completa de los órganos y tejidos de los animales en los grupos de control y dosis alta.
- b) Se deberían examinar todas las lesiones severas.
- c) Los pulmones de los animales en los grupos de dosis baja e intermedia, si se utilizan tales dosis, se debería someter a examen histopatológico para detectar evidencia de infección, dado que esto proporciona una evaluación conveniente del estado de salud de los animales. Se debería también considerar el examen histopatológico del hígado y los riñones en estos grupos. Otros exámenes histopatológicos pueden no ser necesarios de forma rutinaria para los animales en estos grupos pero se deben hacer siempre de los órganos que mostraron evidencia de lesiones en el grupo de la dosis alta.
- d) Cuando se utiliza un grupo control, se puede efectuar la histopatología en aquellos tejidos y órganos identificados por haber mostrado efectos en los grupos tratados.
- e) En general, para estudios crónicos, se deberían utilizar animales centinela para monitorizar la ocurrencia de agentes infecciosos. La serología o histología de los grupos centinela se puede efectuar como se ha indicado.

6.3 Criterios de evaluación

6.3.1 Generalidades

Los datos se pueden resumir en forma de tabla, mostrando para cada grupo, el número de animales al comienzo del ensayo, el número de animales que exhiben lesiones, los tipos de lesiones y el porcentaje de animales que exhiben cada tipo de lesión. Se deberían efectuar evaluaciones estadísticas pero se debería considerar en primer lugar la relevancia biológica. Se pueden utilizar todos los métodos estadísticos generalmente aceptados; los métodos estadísticos se deberían seleccionar durante el diseño del estudio.

6.3.2 Evaluación de los resultados

Las conclusiones de un estudio de exposición repetida se deberían evaluar junto con las conclusiones de los estudios precedentes considerando los efectos tóxicos y las conclusiones de necropsia e histopatológicas. La evaluación debe incluir la relación entre la dosis de la sustancia de ensayo y la presencia o ausencia y la incidencia y severidad de las anomalías, incluyendo anomalías de comportamiento y clínicas, lesiones severas, cambios microscópicos, identificados en órganos diana, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto general o específico.

6.4 Informe final

La información dada en el apartado 5.4 debe estar contenida en el informe final para el estudio de toxicidad sistémica con exposición repetida. Además, se debe proporcionar la información siguiente:

- ensayos hematológicos utilizados y resultados con los datos basales relevantes;
- ensayos de bioquímica clínica utilizados y resultados con los datos basales relevantes;
- hallazgos histopatológicos;
- una evaluación estadística de los resultados cuando se utilizaron y una discusión sobre su significación biológica.

Un estudio de toxicidad sistémica a largo plazo proporcionará información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia de ensayo. La extrapolación de los resultados del estudio a humanos es válida hasta un grado limitado pero puede proporcionar información útil sobre la exposición permisible de seres humanos.

ANEXO A (Informativo)

Rutas de administración

A.1 Generalidades

Se enumeran varias rutas de administración en los capítulos A.2 a A.10. Otras rutas de administración pueden ser clínicamente más relevantes y se deberían utilizar. Se debería utilizar la ruta de administración más relevante. Si se utiliza una ruta alternativa de administración se debe justificar. Se recomienda la consulta de experto cuando se diseñan los estudios apropiados.

A.2 Dérmica

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta dérmica pueden ser apropiados para productos de superficie. Se debería considerar limitar el acceso oral del animal a la muestra de ensayo.

A.3 Implantación

Los ensayos de toxicidad sistémica por implantación pueden ser apropiados para productos implantados. El ensayo puede ser apropiado para ensayo directo de un material por aplicación a un área general o específica. La forma y textura del artículo de ensayo se debería tener en cuenta. Los métodos para la implantación se pueden encontrar en la Norma Internacional ISO 10993-6.

A.4 Inhalación

Los ensayos de toxicidad sistémica por inhalación pueden ser apropiados para productos con un entorno de contacto que de lugar a lixiviación de vapores químicos volátiles, o para una muestra de ensayo en forma de aerosol/partículas con potencial para la inhalación. Los detalles específicos del protocolo para esta ruta de administración se pueden encontrar en la mayoría de los textos dedicados sobre toxicología de la inhalación.

A.5 Intradérmica

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta intradérmica pueden ser apropiados para un producto con un entorno de contacto intradérmico que de lugar a lixiviación de agentes químicos. Las muestras de ensayo se administran normalmente de forma directa a la región intradérmica por inyección. La utilización de lugares de tratamiento múltiples se debería describir y justificar de forma clara.

A.6 Intramuscular

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta intramuscular pueden ser apropiados para productos con un entorno de contacto con tejido muscular que de lugar a lixiviación de agentes químicos. Las muestras de ensayo se administran normalmente de forma directa al tejido muscular por inyección o implantación quirúrgica.

Los lugares necesitan ser escogidos para reducir al mínimo la pérdida de función o la posibilidad de dolor derivado de lesiones nerviosas causadas por tensión de la fibra muscular ejercida por la muestra de ensayo inyectada o implantada. Los lugares se deberían rotar para estudios de dosis repetidas, dado que, por ejemplo, las formulaciones no acuosas pueden permanecer retenidas por almacenamiento durante > 24 h. La utilización de lugares de tratamiento múltiples se debería describir y justificar de forma clara.

A.7 Intraperitoneal

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta intraperitoneal pueden ser apropiados para productos con un entorno de contacto con una vía de fluido o cavidad peritoneal que de lugar a lixiviación de agentes químicos. Esta es también una ruta apropiada cuando el extracto no se debería administrar intravenosamente, tal como los extractos oleosos apolares y cuando pueden existir partículas presentes. Esta ruta es preferible a la filtración para una inyección intravenosa. Las muestras de ensayo se administran como de costumbre directamente a la cavidad peritoneal. Los cálculos de la frecuencia de administración de la dosis deberían considerar que los artículos de ensayo administrados por esta ruta son absorbidos primariamente a través de la circulación portal y por lo tanto deben pasar a través del hígado antes de alcanzar la circulación general. Se debería proceder con cuidado para no inyectar en el estómago o en el tracto intestinal.

A.8 Intravenosa

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta intravenosa pueden ser apropiados para productos con un entorno de contacto directo o indirecto con la sangre o con una vía de fluido que de lugar a lixiviación de agentes químicos. Las muestras de ensayo se colocan como de costumbre o se administran directamente en el sistema vascular. Si existen partículas presentes, se debería considerar la administración por la ruta intraperitoneal o filtración de la muestra. Los volúmenes y tasas de administración de dosificación recomendadas para estudios intravenosos con las especies de animales de laboratorio utilizadas más comúnmente se enumeran en el anexo B.

Se debería proceder con cuidado para reducir al mínimo la posibilidad de inyección extravascular de la muestra de ensayo. Para inyecciones de duración de 5 min. o más, se debería considerar la utilización de una aguja con sistema de fijación de mariposa o un catéter intravenoso.

A.9 Oral

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta oral pueden ser apropiados para productos con un entorno de contacto directo o indirecto con la mucosa oral, o para productos con otra aplicación enteral. Las muestras de ensayo se administran como de costumbre por introducción en el estómago mediante tubo gástrico. Los animales experimentales se deberían generalmente someter a ayuno antes de la administración de la muestra de ensayo. El período de ayuno puede oscilar entre horas hasta durante la noche, con los períodos más cortos para los animales con tasas metabólicas más altas. Después del período de ayuno, los animales se deberían pesar y luego administrarles la muestra de ensayo en una dosis única según el peso corporal. Después de haber administrado la muestra de ensayo, la comida se puede restringir durante un período adicional de 3 h a 4 h. Cuando una dosis se administra en fracciones durante un cierto período, puede ser necesario proporcionar comida y agua a los animales dependiendo de la duración del período.

A.10 Subcutánea

Los ensayos de toxicidad sistémica por la ruta subcutánea pueden ser apropiados para un producto con un entorno de contacto subcutáneo que dé lugar a lixiviación de agentes químicos. Las muestras de ensayo se administran como de costumbre directamente a la región subcutánea por inyección o por implantación. La utilización de lugares de tratamiento múltiples se debería describir y justificar de forma clara.

ANEXO B
(Informativo)

Volúmenes de dosificación

B.1 Generalidades

Los principios de investigación con animales de forma humanitaria requieren que se hagan todos los esfuerzos razonables para reducir al mínimo o eliminar todos los efectos fisiológicos o patológicos adversos. Los valores enumerados en la tabla B.1 son los límites máximos recogidos en la literatura. Estos valores no se deberían tomar como una recomendación en esta parte de la Norma Internacional ISO 10993 pero los investigadores deberían aplicar límites superiores respecto a factores tales como peso corporal, área superficial, velocidad de administración, propiedades fisicoquímicas y biológicas de la muestra de ensayo, y tensión a la que se siente sometido el animal. Se debería proceder de forma que se reduzca al mínimo el volumen de dosificación a la par que se tienen en cuenta estos factores de ajuste.

Tabla B.1- Volúmenes de dosificación máximos para administración de la muestra de ensayo

Especie	Subcutánea ml/kg	Intramuscular ml/kg	Intraperitoneal ml/kg	Introducción en el estómago mediante tubo gástrico	Intravenos a ml/kg
Rata	20	1	20	50	40
Ratón	50	2	50	50	50
Conejo	10	1	20	20	10
Perro	2	1	20	20	10
Mono	5	1	20	15	10

NOTA La reglamentación de países individuales puede dejar sin efecto los volúmenes máximos enumerados en esta tabla. Se recomienda generalmente que las administraciones intramusculares en roedores no deberían sobrepasar 0,1 ml/lugar (ratón) y 0,2 ml/lugar (rata).

B.2 Referencias sobre volumen de dosificación

Véase la bibliografía, Parte 2 [10-15].

ANEXO C
(Informativo)

Señales y observaciones clínicas comunes

Tabla C.1- Señales y observaciones clínicas comunes

Observación clínica	Señal observada	Sistema(s) implicados
Respiratoria	Disnea (respiración abdominal, jadeos), apnea, cianosis, taquipnea, descargas por los orificios nasales	SNC, pulmonar, cardiaco
Actividades motoras	Aumento descenso de la somnolencia, pérdida de equilibrio, anestesia, catalepsia, ataxia, locomoción inusual, postración, temblores, fasciculación	SNC, somatomotor, sensorial, neuromuscular, autonómico
Convulsión	Clónica, tónica, tónico-clónica, por asfixia, opistótonos	SNC, neuromuscular, autonómico, respiratorio
Reflejos	Reflejo corneal, desequilibrante, miotacto, a la luz, de susto	SNC, sensorial, autonómico, neuromuscular
Señales oculares	Lagrimo, miosis, midriasis, exoftalmia, ptosis, opacidad, iritis, conjuntivitis, cromodacriorrea, relajación de la membrana nictitante	Autonómico, irritación
Señales cardiovasculares	Bradycardia, taquicardia, arritmia, vasodilatación, vasoconstricción	SNC, autonómico, cardiaco, pulmonar
Salivación	Excesiva	Autonómico
Erizamiento del vello	Pelo erizado	Autonómico
Analgesia	Disminución de reacción	SNC, sensorial
Tono muscular	Hipotonía, hipertonia	Autonómico
Gastrointestinal	Deposición blanda, diarrea, emesis, diuresis, rinorrea	SNC, autonómico, sensorial, motilidad gastrointestinal, renal
Piel	Edema, eritema	Daños tisulares, irritación

ANEXO D
(Informativo)

Mediciones hematológicas, de química clínica, y de análisis de orina recomendadas

D.1 Hematología

- Potencial de coagulación (PT, APTT)
- Concentración de hemoglobina
- Hematocrito
- Recuento de plaquetas
- Recuento de hematíes
- Recuento de leucocitos
- Diferencial leucocitario

D.2 Química clínica

- Albúmina
- ALP
- ALT
- AST
- Calcio
- Cloruro
- Colesterol
- Creatinina
- GCT
- Glucosa
- Fósforo inorgánico
- Potasio
- Sodio
- Bilirrubina total
- Proteína total
- Triglicéridos
- Nitrógeno ureico
- Enzimas adicionales, según proceda científicamente
- Los niveles de inmunoglobulina total se pueden considerar un indicador de inmunotoxicidad

D.3 Análisis de orina (recogida cronometrada, por ejemplo, de 16 h a 24 h)

- Aspecto
- Bilirrubina
- Glucosa
- Cetonas
- Sangre oculta
- Proteína
- Sedimento
- Peso específico u osmolalidad
- Volumen
- Otros ensayos científicamente apropiados si el artículo de ensayo se sospecha que causa toxicidad en órgano específico (generalmente requiere la recogida de muestra refrigerada).

ANEXO E
(Informativo)

Listado de órganos recomendados para evaluación histopatológica

Cápsulas suprarrenales*¹⁻¹

Todas las lesiones severas (incluyendo los lugares de tratamiento)

Aorta

Médula ósea (fémur, costillas o esternón)

Cerebro* (secciones representativas incluyendo cerebro, cerebelo y protuberancia)

Ciego

Colon

Duodeno

Epidídimo*

Esófago

Ojos

Vesícula biliar (si está presente)

Corazón*

Íleon

Yeyuno

Riñones*

Hígado*

Pulmones y bronquios (preservados por inflado con adhesivo y posterior inmersión)

Nódulos linfáticos (locales para cubrir el lugar de administración y distantes para cubrir efectos sistémicos)

Glándulas mamarias (hembras)

Músculo (esquelético)

Cartílagos nasales (para estudios de inhalación)

Nervios (ciático o tibial) preferiblemente en proximidad cercana al músculo

Ovarios*

Páncreas

Paratiroides

Pituitaria

Próstata

Recto

Glándulas salivares

Vesículas seminales

Piel

Médula espinal

Bazo*
Esternón
Estómago
Testículos*
Timo*
Tiroides
Traquea
Vejiga urinaria
Útero* (incluyendo cuello del útero y oviductos)
Vagina

1) Además de la evaluación histopatológica, los órganos/tejidos marcados con un asterisco (*) se deberían pesar, pesando también otros órganos si procede científicamente. Las conclusiones clínicas y de otra índole pueden sugerir la necesidad de examinar tejidos adicionales. Además, se debería preservar cualquier órgano considerado como posible órgano diana basándose en las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

La histopatología total se debería practicar para los órganos y tejidos preservados de todos los animales en el grupo de control y de dosis más alta. Estos exámenes, utilizando órganos/tejidos diana específicos según sea necesario, se deberían extender a animales de todos los otros grupos de dosis si se observan cambios relacionados con el tratamiento en el grupo de la dosis más alta.

ANEXO F (Informativo)

Información sobre pirógenos mediados por materiales

La pirogenicidad es la capacidad de un agente químico u otra sustancia para producir una respuesta febril. Las respuestas pirogénicas pueden ser mediadas por materiales, mediadas por endotoxinas, o mediadas por otras sustancias, tales como componentes de bacterias gram-positivas y hongos. Esta parte de la Norma Internacional ISO 10993 cubre la pirogenicidad mediada por materiales.

No es necesario ensayar todos los equipos médicos nuevos para la pirogenicidad in vivo. Sin embargo, los materiales que contienen entidades o sustancias químicas nuevas que han causado previamente una respuesta pirogénica, se deberían evaluar para pirogenicidad mediada por materiales. La contaminación por endotoxinas puede ser una fuente de una respuesta pirogénica, y no se debería confundir con una respuesta pirogénica mediada por el material.

- Pirogenicidad mediada por endotoxinas

Esta forma de pirogenicidad que se origina de las endotoxinas biológicamente activas de las bacterias gram negativas, que es normalmente una contaminación inductora de fiebre en el proceso de fabricación de equipos médicos, se evalúa por medición de la cantidad de endotoxina en los productos mediante un ensayo LAL (lisado de amebocitos del límulo) específico de endotoxinas sin efectuar un ensayo en conejo²⁻¹.

- Pirogenicidad mediada por materiales

Este tipo de pirogenicidad tiene su origen en factores no relacionados con endotoxinas. A continuación se enumeran las sustancias que se sabe generan una respuesta pirogénica, sin ser endotoxinas:

- pirógenos endógenos (por ejemplo, IL-1, IL-6, TNF α , INF- γ);
- prostaglandina;
- inductores (por ejemplo, ácidos poliadenílico, poliuridílico, polibionosínico y poliribocitidílico);
- sustancias que interrumpen la función de los centros termorreguladores (por ejemplo, LSD, cocaína, morfina);
- agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa (por ejemplo, 4, 6-dinitro-o-cresol, dinitrofenol, ácido pícrico);
- N-fenil-j6-naftilamina y aldo-a-naftilamina (el mecanismo febril es desconocido);
- exotoxinas bacterianas (por ejemplo, TSST-1, SEA, Spe F, Spe C);
- neurotransmisores (por ejemplo, noradrenalina, serotonina);
- metales, como las sales de níquel, en algunos casos.

2) Ensayo LAL AAMI/ST72 — Endotoxina bacteriana — Metodologías de ensayo, monitorización de rutina, y alternativas al ensayo por lotes.

Para la detección de la pirogenicidad mediada por materiales, se recomienda el ensayo de pirógenos en conejo, que tiene un espectro amplio para detección de la actividad pirogénica. Los métodos para efectuar el ensayo de pirógenos en conejo se pueden encontrar en la farmacopea de los EEUU, la farmacopea europea y la farmacopea japonesa. El ensayo LAL no es adecuado para determinar la pirogenicidad de estas sustancias. Si se desarrollan otros métodos para detectar la pirogenicidad no mediada por endotoxinas, y se logra validarlos, estos métodos se considerarán para sustituir al ensayo en conejo.

Existen técnicas recientes que son determinaciones analíticas basadas en la liberación de citoquinas por los monocitos/macrófagos que son capaces de detectar pirogenicidad relacionada con componentes de bacterias gram negativas, bacterias gram positivas y hongos. Estas determinaciones no están validadas para pirogenicidad mediada por materiales.

Bibliografía

1 General

- [1] U.S./EPA PB 86/108958 y 89/124077
- [2] U.S./FDA Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives, 1982 [3] U.S. Code of Federal Regulation 1500.40: Method of Testing Toxic Substances.
- [4] United States Pharmacopoeia 26: Biological Reactivity Tests, In Vivo; The National Formulary 21, Rockville, MD; Pharmacopoeial Convention, 2003, pp. 2028-2032
- [5] ASTM F619-03, Standard Practice for Extraction of Medical Plastics
- [6] SN 119800:1990, Biological Evaluation of Dental Materials
- [7] European Pharmacopoeia 4th Edition, 2002
- [8] MHLW Notification No. 0213001 (2003.02.13). Principles for Biological Safety Evaluation of Medical Devices
- [9] HALLE, W. (2003) The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce animal testing, ATLA 31:89-98

2 Referencias de volúmenes de dosificación

- [10] HULL, R.M. Guideline limit volumes for dosing animals in the preclinical stage of safety evaluation, Human and Environmental Toxicology, 1995, 14, pp. 305-307
- [11] DERELANKO, M.J. and HOLLINGER, M.A. CRC Handbook of Toxicology, CRC Press, NY, 2nd edition, 2001, p. 98
- [12] DIEHL, K.-H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, J. Applied Toxicology, 21, 2001, pp. 15-23
- [13] MORTON, D. et al. Effects of infusion rates in rats receiving repeated large volumes of intravenous saline solution, Laboratory Animal Sciences, 47, 1997, pp. 656-659
- [14] RICHMOND, J.D. Dose limit volumes: The United Kingdom view - past and present. Presented at the Humane Society of the United States - Refinement in Toxicology Testing: Dosing Data: Volume and Frequency, March, 14. 1999, New Orleans, LA
- [15] MORTON, D.B. et al. refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement, Laboratory Animals, 35, 2001, pp 1-41