

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

ISO 10993-5: 2013  
Publicada por la ISO en 2009

---

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS — PARTE 5:  
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO  
(ISO 10993-5:2009, IDT)**

Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

---

ICS: 11.040.01

1. Edición    Noviembre 2013  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, 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

## **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.
  - Instituto Central de Investigación Digital.
  - Centro Nacional de Electromedicina.
  - Instituto de Oncología y Radiobiología
  - Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
  - Instituto de Investigaciones en Metrología.
  - Centro para el Control Estatal de la Calidad de los
  - Instituto de Investigaciones en Normalización.
  - Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos
  - MEDICUBA
  - Comisión Asesora de Equipos Médicos.
  - Ministerio de Comunicaciones.
  - Complejo Ortopédico “Frank País”.
  - Oficina Nacional de Normalización.
  - Grupo Nacional de Anestesiología.
  - Red Funcional de Implantología.
  - Grupo Nacional de Estomatología.
  
- Esta edición anula y sustituye a la NC-ISO 10993-5:2002 *Evaluación biológica de equipos médicos. Parte 5: Ensayos para la citotoxicidad in vitro*, la cual ha sido revisada técnicamente.

### **© NC, 2013**

**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, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

## PRÓLOGO

Esta tercera edición anula y sustituye a la segunda edición (ISO 10993-5:1999) que ha sido revisada técnicamente.

La Norma ISO 10993 consiste en las siguientes partes, bajo el título general **Evaluación biológica de equipos médicos**:

- *Parte 1: Evaluación y ensayos.*
- *Parte 2: Requisitos relativos a la protección de los animales.*
- *Parte 3: Ensayos de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción.*
- *Parte 4: Selección de los ensayos para las interacciones con la sangre.*
- *Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro.*
- *Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación.*
- *Parte 7: Residuos de la esterilización por óxido de etileno.*
- *Parte 9: Marco para la identificación y cuantificación de productos potenciales de degradación.*
- *Parte 10: Ensayos de irritación y de hipersensibilidad retardada.*
- *Parte 11: Ensayos de toxicidad sistémica.*
- *Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.*
- *Parte 13: Identificación y cuantificación de los productos de degradación de equipos médicos poliméricos.*
- *Parte 14: Identificación y cuantificación de los productos de degradación de materiales cerámicos.*
- *Parte 15: Identificación y cuantificación de los productos de degradación de metales y aleaciones.*
- *Parte 16: Diseño del estudio toxicocinético de productos de degradación y sustancias lixiviables.*
- *Parte 17: Establecimiento de los límites permisibles para sustancias lixiviables.*
- *Parte 18: Caracterización química de materiales.*
- *Parte 19: Caracterización fisicoquímica, morfológica y topográfica de los materiales.*
- *Parte 20: Principios y métodos para ensayos de inmunotoxicología de equipos médicos.*

## Índice

<b>0</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Objeto y Campo de Aplicación</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Normas para consulta</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Términos y definiciones</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Preparación de la muestra y controles</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Líneas celulares</b>	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Preparación del cultivo celular de reserva</b>	<b>11</b>
<b>8</b>	<b>Procedimientos de ensayo</b>	<b>12</b>
<b>8.1</b>	<b>Número de réplicas</b>	<b>12</b>
<b>8.2</b>	<b>Ensayo de los extractos</b>	<b>12</b>
<b>8.3</b>	<b>Ensayo por contacto directo</b>	<b>13</b>
<b>8.4</b>	<b>Ensayo por contacto indirecto</b>	<b>14</b>
<b>8.5</b>	<b>Determinación de la citotoxicidad</b>	<b>15</b>
<b>9</b>	<b>Informe del ensayo</b>	<b>18</b>
<b>10</b>	<b>Evaluación de los resultados</b>	<b>18</b>
	<b>Anexo A (informativo) Ensayo de Citotoxicidad por captación de rojo neutro</b>	<b>19</b>
	<b>Anexo B (informativo) Ensayo de Citotoxicidad con formación de colonias</b>	<b>27</b>
	<b>Anexo C (informativo) Ensayo de toxicidad por MTT</b>	<b>32</b>
	<b>Anexo D (informativo) Ensayo de Citotoxicidad XTT</b>	<b>37</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>43</b>

## Introducción

Debido a la aplicabilidad general de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y a su utilización generalizada para evaluar un rango grande de productos y materiales, el propósito de esta parte de la Norma ISO 10993 es, más que especificar un único ensayo, definir un esquema para el ensayo que requiera la toma de decisiones en una serie de etapas.

Esto debería conducir a la selección del ensayo más apropiado.

Se enumeran tres categorías de ensayo: ensayo del extracto, ensayo de contacto directo, ensayo de contacto indirecto.

La elección de una o más de estas categorías depende de la naturaleza de la muestra a evaluar, del lugar potencial de utilización y de la naturaleza de la utilización.

Esta elección determina entonces los detalles de la preparación de las muestras a ensayar, la preparación de las células de cultivo, y la forma en que las células se exponen a las muestras o a sus extractos.

Al final del tiempo de exposición, se efectúa la evaluación de la presencia y alcance del efecto citotóxico. Es la intención de esta parte de la Norma ISO 10993 dejar abierta la elección del tipo de evaluación. Tal estrategia hace disponible un conjunto de ensayos, que refleja el criterio de muchos grupos que abogan por los ensayos biológicos *in vitro*.

Los numerosos métodos utilizados y los criterios de valoración final medidos en la determinación de la citotoxicidad se pueden agrupar en las categorías de evaluación siguientes:

- evaluaciones del daño celular por un medio morfológico;
- mediciones del daño celular;
- mediciones del crecimiento celular;
- mediciones de aspectos específicos del metabolismo celular.

Existen varios medios de producir resultados en cada una de estas cuatro categorías. El investigador debería tener presentes las categorías del ensayo y en cuál categoría encaja una técnica particular, para que se puedan hacer comparaciones con otros resultados en productos o materiales similares tanto a nivel intralaboratorio como interlaboratorios. En los anexos se dan ejemplos de los protocolos de ensayo cuantitativos. Las recomendaciones para la interpretación de los resultados se dan en esta parte de la Norma ISO 10993.

## EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS — PARTE 5: ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

### 1 Objeto y Campo de Aplicación

Esta parte de la Norma ISO 10993 describe los métodos de ensayo para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los equipos médicos.

Estos métodos especifican la incubación de las células de cultivo en contacto con un producto y/o extractos de un producto ya sea directamente o por difusión.

Estos métodos están diseñados para determinar la respuesta biológica de las células de mamífero *in vitro* utilizando parámetros biológicos apropiados.

### 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 mediante un proceso de gestión de riesgo.
- ISO 10993-12 Evaluación biológica de equipos médicos. Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.

### 3 Términos y definiciones

Para los fines de este documento, se aplican los términos y definiciones incluidos en la Norma ISO 10993-1 además de los siguientes:

#### 3.1 recipientes de cultivo:

Recipientes apropiados para el cultivo celular incluyendo placas Petri de vidrio, matraces de cultivo de plástico o placas de varios pocillos y placas de microtitulación de plástico.

NOTA Estos recipientes se pueden utilizar de forma intercambiable en estos métodos siempre que cumplan los requisitos de la calidad del cultivo celular y sean adecuados para su utilización con células de mamífero.

#### 3.2 material de control positivo:

Material que, cuando se ensaya de acuerdo con esta parte de la Norma ISO 10993, proporciona una respuesta citotóxica reproducible.

NOTA El propósito del control positivo es demostrar una respuesta apropiada del sistema de ensayo. Por ejemplo, se ha utilizado un poliuretano con organoestánico estabilizado<sup>1</sup> como control positivo para materiales sólidos y extractos. Las diluciones de fenol, por ejemplo, se han utilizado como un control positivo para extractos. Además de un material, se pueden utilizar también productos químicos puros para demostrar las prestaciones del sistema de ensayo.

---

<sup>1</sup> Los poliuretanos ZDEC y ZDBC están disponibles solicitándolos al Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japón.

### 3.3 blanco:

Vehículo de extracción que no contiene la muestra de ensayo, retenido en un recipiente idéntico al utilizado para alojar la muestra de ensayo y sometido a condiciones idénticas a las que se somete a la muestra de ensayo durante la extracción.

NOTA El propósito del blanco es evaluar los efectos interferentes posibles debidos al recipiente de extracción, al vehículo y al proceso de extracción.

### 3.4 material de control negativo:

Material que, cuando se ensaya de acuerdo con esta parte de la Norma ISO 10993, no produce ninguna respuesta citotóxica.

NOTA El propósito del control negativo es demostrar la respuesta de fondo de las células. Por ejemplo, se han utilizado polietileno de alta densidad<sup>2</sup> para los polímeros sintéticos, y barras cerámicas de óxido de aluminio para material dental como controles negativos.

### 3.5 muestra de ensayo:

Material, producto, porción de producto, componente, extracto o porción de éste que se somete al ensayo o evaluación biológica o química.

### 3.6 subconfluencia:

Confluencia de aproximadamente el 80%, es decir, el final de la fase logarítmica del crecimiento.

## 4 Preparación de la muestra y controles

### 4.1 Generalidades

El ensayo se debe efectuar utilizando

a) un extracto de la muestra de ensayo

y/o

b) la propia muestra de ensayo.

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo con la Norma ISO 10993-12. Se deben incluir los controles negativos y positivos en cada ensayo.

---

<sup>2</sup> El polietileno de alta densidad se puede obtener por solicitud a la U.S. Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) y a la Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochial 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japón). La información dada en las notas al pie 1) y 2) es para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma ISO 10993 y no constituye un respaldo de la ISO a estos productos. Se pueden utilizar productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

## 4.2 Preparación de los extractos líquidos del material

### 4.2.1 Principios de la extracción

Las condiciones de extracción deberían intentar simular o exagerar las condiciones de utilización clínica para determinar el peligro toxicológico potencial sin causar cambios significativos en la muestra de ensayo, tales como su fusión, fundido o cualquier alteración de la estructura química, a menos que esto se espere durante la aplicación clínica. Debido a la naturaleza de ciertos materiales (por ejemplo, los materiales biodegradables), la alteración de la estructura química puede ocurrir durante el procedimiento de extracción.

NOTA La concentración de cualquier sustancia endógena o extraña en el extracto, y por tanto la cantidad expuesta a las células de ensayo, depende del área interfacial, volumen de extracción, pH, solubilidad química, velocidad de difusión, osmolaridad, agitación, temperatura, tiempo y otros factores.

Para los productos que entrañan el mezclado de dos o más componentes en el paciente para llegar al producto final (por ejemplo, cemento óseo), el producto final no se debería lavar antes de la extracción. El lavado de la muestra de ensayo puede reducir o eliminar residuos presentes en el producto. Si la muestra de ensayo se ha de utilizar en un entorno estéril, se debería utilizar una muestra de ensayo esterilizada para extraer los constituyentes químicos.

### 4.2.2 Vehículo de extracción

Se debe justificar y documentar la elección del (de los) vehículo(s) de extracción teniendo en cuenta las características químicas de la muestra de ensayo. Para los análisis de células de mamífero se deben utilizar uno o más de los vehículos siguientes:

- a) medio de cultivo con suero;
- b) solución salina fisiológica;
- c) otro vehículo adecuado.

La elección del vehículo debería reflejar el objetivo de la extracción. Se debe considerar la utilización de vehículos tanto polares como apolares. El medio de cultivo con suero es el vehículo de extracción preferido. La utilización del medio de cultivo con suero se prefiere para la extracción debido a su capacidad para sostener el crecimiento celular así como para extraer sustancias tanto polares como apolares. Además del medio de cultivo con suero, se debería considerar la utilización de medio de cultivo sin suero para extraer específicamente sustancias polares (por ejemplo, compuestos iónicos). Otros vehículos adecuados incluyen el agua purificada y el dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO es citotóxico en sistemas de ensayo seleccionados a concentraciones superiores al 0,5% (fracción volúmica). La concentración de exposición celular de las sustancias extraíbles en DMSO será inferior debido a la mayor dilución comparada con la extracción en medio de cultivo con suero.

NOTA 1 Se podrían utilizar diferentes tipos de suero (por ejemplo, fetal, suero bovino/de ternera, suero de ternera recién nacida) y la elección del suero depende del tipo de célula.

NOTA 2 Es importante reconocer que el suero/proteínas pueden, en cierto grado, formar enlaces con las sustancias extraíbles.



### 4.2.3 Condiciones de extracción

**4.2.3.1** La extracción se debe efectuar en recipientes cerrados, químicamente inertes y estériles utilizando técnicas asépticas, de acuerdo con la Norma ISO 10993-12.

**4.2.3.2** Exceptuando las circunstancias mencionadas a continuación, la extracción se debe efectuar en una de las condiciones siguientes y se deben aplicar de acuerdo con las características del producto y las condiciones específicas de utilización:

- a)  $(24 \pm 2)$  h a  $(37 \pm 1)$  °C;
- b)  $(72 \pm 2)$  h a  $(50 \pm 2)$  °C;
- c)  $(24 \pm 2)$  h a  $(70 \pm 2)$  °C;
- d)  $(1 \pm 0,2)$  h a  $(121 \pm 2)$  °C.

Las condiciones de extracción descritas arriba, que se han utilizado para proporcionar una medida del potencial de peligro para la estimación del riesgo del producto o material, están basadas en el precedente histórico. Se pueden utilizar otras condiciones, por ejemplo, tiempos de extracción prolongados o acortados a 37 °C, que simulen la extracción que ocurre durante la utilización clínica o que proporcionen una medida adecuada del potencial de peligro, pero tales condiciones se deben justificar y documentar. Para equipos médicos con contacto a corto plazo (no superior a 4 h de duración de contacto acumulativa) con piel o mucosa intacta y que no se implantan, las condiciones pueden incluir tiempos de extracción inferiores a 24 h pero no inferiores a 4 h, según se especifican en a) a c).

El medio de cultivo celular con suero se debería utilizar solamente de acuerdo con a) porque las temperaturas de extracción superiores a  $(37 \pm 1)$  °C pueden afectar adversamente la química y/o la estabilidad del suero y de otros constituyentes en el medio de cultivo.

Para las muestras de ensayo poliméricas, la temperatura de extracción no debería ser superior a la temperatura de transición vítrea pues las temperaturas más altas pueden cambiar la composición del extractante.

**4.2.3.3** Si el extracto se filtra, centrifuga o procesa por otros métodos antes de ser aplicado a las células, estos detalles se deben registrar en el informe final junto con la justificación de las etapas adicionales (véase el capítulo 9). Se debe notificar cualquier ajuste del pH del extracto. Se debería evitar la manipulación del extracto, tal como por ajuste del pH, porque ello podría influir sobre el resultado.

## 4.3 Preparación del material para los ensayos por contacto directo

### 4.3.1 Forma de las muestras de ensayo

Los materiales que tienen formas, tamaños o estados físicos diversos (por ejemplo, líquidos, geles, sólidos, etc.) se pueden ensayar sin modificación en los análisis de citotoxicidad.

La muestra de ensayo preferida de un material sólido debería tener al menos una superficie plana. Si no es así, se deben hacer ajustes para lograr superficies planas.

### **4.3.2 Esterilidad de las muestras de ensayo**

**4.3.2.1** Se debe tener en cuenta la esterilidad de la muestra de ensayo.

**4.3.2.2** Las muestras de ensayo de productos esterilizados se deben manipular asépticamente durante el procedimiento de ensayo.

**4.3.2.3** Las muestras de ensayo de los productos que se suministran normalmente no estériles pero que se esterilizan antes de su utilización se deben esterilizar por el método recomendado por el fabricante y se deben manipular asépticamente durante el procedimiento de ensayo.

Se debería considerar el efecto de los métodos o agentes de esterilización sobre el producto al definir la preparación de la muestra de ensayo antes de utilizarla en el sistema de ensayo.

**4.3.2.4** Las muestras de ensayo de los productos que no requieren ser estériles al utilizarlos se deben utilizar según se suministran y se deben manipular asépticamente durante el procedimiento de ensayo. Puede ser justificable esterilizar el material de ensayo para evitar la contaminación microbiana del cultivo celular; sin embargo, el proceso de esterilización no debe alterar las propiedades del material de ensayo.

Si se utilizan muestras de ensayo no estériles, se debería verificar su estado de contaminación bacteriana porque la contaminación puede llevar a una evaluación falsa de citotoxicidad.

### **4.3.4 Muestras de ensayo líquidas**

Las muestras de ensayo líquidas se deben ensayar ya sea

a) por deposición directa,

o

b) por deposición sobre una matriz absorbente biológicamente inerte.

Los discos de filtro se han encontrado adecuados para utilizarlos como matrices absorbentes inertes.

### **4.3.5 Muestras de ensayo absorbentes**

Si procede, las muestras de ensayo que son absorbentes se deben empapar con medio de cultivo antes del ensayo para impedir la adsorción del medio de cultivo en el recipiente de ensayo.

## **4.4 Preparación de los controles**

Los controles se deberían seleccionar de forma que se puedan preparar por el mismo procedimiento que la muestra de ensayo.

## 5 Líneas Celulares

Se prefieren líneas celulares establecidas y cuando se usen, se deben obtener a partir de repositorios reconocidos<sup>3</sup>.

Cuando se requiere sensibilidad específica, se deben utilizar cultivos celulares primarios, líneas celulares y cultivos organotípicos obtenidos directamente a partir de tejidos vivos si se pueden demostrar la reproducibilidad y exactitud de la respuesta.

Si se almacena un cultivo de reserva de una línea celular, el almacenamiento debe ser a - 80 °C o temperatura inferior en el medio de cultivo correspondiente pero conteniendo un crioprotector, por ejemplo, dimetilsulfóxido o glicerol. El almacenamiento a largo plazo (varios meses hasta muchos años) es posible solamente a - 130 °C o temperatura inferior.

Esta información se da para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma ISO 10993 y no constituye un respaldo de la ISO a los productos nombrados. Se pueden utilizar otras líneas celulares si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

Se deben utilizar solamente células exentas de micoplasma para el ensayo. Antes de la utilización, los cultivos de reserva se deberían ensayar para verificar la ausencia de micoplasma.

Es importante verificar las células regularmente (por ejemplo, su morfología, el tiempo de duplicación, el número modal de cromosomas) porque la sensibilidad en los ensayos puede variar con el número de pases.

Se deberían utilizar buenas prácticas de cultivo celular. Véase la referencia [5].

## 6 Medio de Cultivo

El medio de cultivo debe ser estéril.

El medio de cultivo con o sin suero debe cumplir los requisitos de crecimiento de la línea celular seleccionada. Se pueden incluir antibióticos en el medio siempre que no afecten adversamente los análisis. Se deben validar las condiciones de almacenamiento.

NOTA La estabilidad del medio de cultivo varía con la composición y las condiciones de almacenamiento.

El medio de cultivo se debe mantener a un pH comprendido entre 7,2 y 7,4.

## 7 Preparación del Cultivo Celular de Reserva

Utilizando la línea celular escogida y el medio de cultivo, se preparan células suficientes para completar el ensayo. Si las células han de crecer a partir de cultivos tomados del almacenamiento, se elimina el crioprotector, si está presente. Las células se subcultivan al menos una vez antes de utilizarlas.

---

<sup>3</sup> Por ejemplo, las líneas celulares CCL 1 (clon 929 de la NCTC), CCL 163 (clon A31 de la Balb/3T3), CCL 171 (MRC-5) y CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) y CCL 10 [BHK-21 (C-13)] y V-79 379A de la American Type Culture Collection están respaldadas por expertos de la ISO como adecuadas.

Cuando se subcultivan células, éstas se retiran y se suspenden por desagregación enzimática y/o mecánica utilizando un método apropiado para la línea celular.

## **8 Procedimientos de Ensayo**

### **8.1 Número de réplicas**

Se debe utilizar un mínimo de tres réplicas para las muestras de ensayo y los controles.

### **8.2 Ensayo de los extractos**

**8.2.1** Este ensayo permite la evaluación tanto cualitativa como cuantitativa de la citotoxicidad.

**8.2.2** Se pipetea una alícuota de la suspensión celular agitada continuamente en cada uno de un número suficiente de recipientes para la exposición a los extractos. Se distribuyen las células homogéneamente sobre la superficie de cada recipiente por rotación suave.

**8.2.3** Se incuban los cultivos a  $(37 \pm 1)$  °C en aire con o sin dióxido de carbono según sea apropiado para el sistema tampón escogido para el medio de cultivo.

El ensayo se debería efectuar sobre una monocapa subconfluyente o en células recientemente suspendidas. En el análisis de la formación de colonias se debe utilizar solamente una densidad celular baja apropiada.

**8.2.4** Se verifica la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

En casos excepcionales, las células con crecimiento exponencial (por ejemplo, células primarias, células con tasa alta de proliferación) se pueden sembrar en el momento del comienzo del ensayo.

**8.2.5** El ensayo se efectúa tomando

a) el extracto original

y/o

b) el extracto original y una serie de dilución de los extractos utilizando el vehículo de extracción como diluyente.

De forma alternativa, cuando se sabe o se sospecha la presencia de materiales de solubilidad limitada, la dilución se debería efectuar variando la proporción de extracción original de la muestra de ensayo al medio de extracción.

Si se utilizan monocapas para el ensayo, se retira y desecha el medio de cultivo de los cultivos y se añade una alícuota del extracto o de la dilución de éste en cada uno de los recipientes.

Si se utilizan células suspendidas para el ensayo, se añade el extracto o la dilución de éste en cada uno de los recipientes de réplica, inmediatamente después de la preparación de la suspensión celular.

**8.2.6** Cuando se utiliza un extracto no fisiológico, por ejemplo, agua, el extracto se debe ensayar a la concentración fisiológicamente compatible más alta después de la dilución en medio de cultivo.

NOTA Se recomienda medio de cultivo concentrado, por ejemplo, 2x, 5x, para utilización en la dilución de extractos acuosos.

**8.2.7** Se añaden alícuotas conocidas del blanco y los controles negativo y positivo a los recipientes de réplica adicionales.

NOTA Se puede ensayar también un control del medio de cultivo recientemente preparado, si procede.

**8.2.8** Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones descritas en el apartado 8.2.3 durante un intervalo apropiado correspondiente al análisis específico seleccionado.

**8.2.9** Después de un periodo de incubación de al menos 24 h, se determinan los efectos citotóxicos de acuerdo con el apartado 8.5.

### **8.3 Ensayo por contacto directo**

**8.3.1** Este ensayo permite la evaluación tanto cualitativa como cuantitativa de la citotoxicidad.

**8.3.2** Se pipetea una alícuota conocida de la suspensión celular agitada continuamente en cada uno de un número suficiente de recipientes para la exposición directa a la muestra de ensayo. Se distribuyen las células homogéneamente sobre la superficie de cada recipiente por rotación horizontal suave.

**8.3.3** Se incuba el cultivo a  $(37 \pm 1)$  °C en aire, con o sin dióxido de carbono según sea apropiado para el sistema tampón escogido para el medio de cultivo, hasta que el crecimiento de los cultivos haya llegado a la subconfluencia.

**8.3.4** Se verifica la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

En casos excepcionales, las células con crecimiento exponencial (por ejemplo, células primarias, células con tasa alta de proliferación) se pueden sembrar en el momento del comienzo del ensayo.

**8.3.5** Se retira y desecha el medio de cultivo. Entonces se añade medio de cultivo nuevo a cada recipiente.

**8.3.6** Se colocan con cuidado muestras individuales de la muestra de ensayo sobre la capa celular en el centro de cada uno de los recipientes de réplica. Se asegura que la muestra cubra aproximadamente un décimo de la superficie de la capa celular.

Se pueden utilizar otras proporciones de superficie de la muestra a superficie de la capa celular si así se justifica.

Se procede con cuidado para impedir el movimiento innecesario de las muestras, pues esto podría causar un traumatismo físico a las células. Por ejemplo, el movimiento innecesario puede causar parches de células desalojadas.

NOTA Cuando proceda, la muestra se puede colocar en el recipiente de cultivo antes de la adición de las células.

**8.3.7** Se preparan los recipientes de réplica tanto para el material de control negativo como de control positivo.

**8.3.8** Se incuban los recipientes en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 8.3.3 para un intervalo apropiado (un mínimo de 24 h) correspondiente al análisis específico seleccionado.

**8.3.9** Se desecha el medio de cultivo sobrenadante antes de la adición de los productos químicos/colorantes para determinar los efectos citotóxicos de acuerdo con el apartado 8.5.

## **8.4 Ensayo por contacto indirecto**

### **8.4.1 Difusión en agar**

**8.4.1.1** Este ensayo permite una evaluación cualitativa de la citotoxicidad. Este análisis no es apropiado para los lixiviados que no pueden difundir a través de la capa de agar, o que puedan reaccionar con el agar. Se debe justificar la utilización del análisis de difusión en agar para la evaluación de la citotoxicidad.

**8.4.1.2** Se pipetea una alícuota conocida de la suspensión celular agitada continuamente en cada uno de un número suficiente de recipientes de réplica para el ensayo. Se distribuyen las células homogéneamente sobre la superficie de cada recipiente por rotación horizontal suave.

**8.4.1.3** Se incuban los cultivos a  $(37 \pm 1)$  °C en aire, con o sin dióxido de carbono según sea apropiado para el sistema tampón escogido para el medio de cultivo, hasta que el crecimiento de los cultivos haya llegado aproximadamente a la subconfluencia al final de la fase logarítmica de la curva de crecimiento.

**8.4.1.4** Se verifica la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

**8.4.1.5** Se retira y desecha el medio de cultivo del recipiente. Entonces se mezcla medio de cultivo nuevo conteniendo suero con agar fundido para obtener una concentración de agar en la masa final de 0,5% a 2% y se pipetea un volumen apropiado en cada recipiente. Se utiliza solamente agar que sea adecuado para el crecimiento de células de mamífero en cultivo. La mezcla de agar/medio de cultivo debería estar en un estado líquido y a una temperatura que sea compatible con las células de mamífero.

NOTA El agar está disponible en diversos rangos de peso molecular y pureza.

**8.4.1.6** Se colocan con cuidado los preparados de réplica de la muestra de ensayo sobre la capa de agar solidificado en cada recipiente. Se asegura que la muestra cubra aproximadamente un décimo de la superficie de la capa celular.

Se pueden utilizar otras proporciones de superficie de la muestra a superficie de la capa celular si así se justifica.

Se empapa previamente cualquier material absorbente con el medio de cultivo antes de colocarlo sobre el agar para impedir la deshidratación del agar.

**8.4.1.7** Se preparan los recipientes de réplica conteniendo tanto el material de control negativo como de control positivo.

**8.4.1.8** Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones que las descritas en los apartados 8.4.1.3 durante 24 h a 72 h.

**8.4.1.9** Se examinan las células para determinar el efecto citotóxico antes y después retirando con cuidado las muestras del agar.

La utilización de tinción vital, por ejemplo, rojo neutro, puede facilitar la detección de la citotoxicidad. El colorante de tinción vital se puede añadir antes o después de la incubación con la muestra. Si la tinción se añade antes de la incubación, los cultivos se protegen de la luz para impedir el daño celular causado por la fotoactivación de la tinción.

## **8.4.2 Difusión en filtro**

**8.4.2.1** Este ensayo permite una evaluación cualitativa de la citotoxicidad.

**8.4.2.2** Se coloca un filtro exento de tensoactivo con un tamaño de poro de 0,45 µm en cada recipiente y se añade una alícuota conocida de la suspensión celular agitada continuamente en cada uno de un número suficiente de recipientes de réplica para el ensayo. Se distribuyen las células homogéneamente sobre la superficie de cada filtro por rotación suave.

**8.4.2.3** Se incuban los cultivos a  $(37 \pm 1)$  °C en aire, con o sin dióxido de carbono según sea apropiado para el sistema tampón escogido para el medio de cultivo, hasta que el crecimiento de los cultivos haya llegado aproximadamente a la subconfluencia al final de la fase logarítmica de la curva de crecimiento.

**8.4.2.4** Se retira y desecha el medio de cultivo de los recipientes. Entonces se transfieren los filtros, con el lado de las células para abajo, sobre una capa de agar solidificado (véase 8.4.1.5).

**8.4.2.5** Se colocan con cuidado los preparados de réplica de la muestra de ensayo sobre el lado acelular (superior) del filtro. Los extractos líquidos y los compuestos recientemente mezclados se retienen en anillos no reactivos colocados sobre el filtro.

**8.4.2.6** Se preparan filtros de réplica con el material tanto de control negativo como de control positivo.

**8.4.2.7** Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones descritas en el apartado 8.4.2.3 durante  $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ .

**8.4.2.8** Se retiran con cuidado las muestras del filtro y se separa con cuidado el filtro de la superficie del agar.

**8.4.2.9** Se determinan los efectos citotóxicos utilizando un procedimiento de tinción apropiado.

## **8.5 Determinación de la citotoxicidad**

**8.5.1** Se determinan los efectos citotóxicos ya sea de forma cualitativa o cuantitativa. Es preferible la evaluación cuantitativa de la citotoxicidad. La evaluación cualitativa es apropiada solamente para los ensayos de detección.

**Evaluación cualitativa:** Se examinan las células al microscopio utilizando tinción citoquímica si se desea. Se evalúan los cambios, por ejemplo, en la morfología general, vacuolización, desprendimiento, lisis celular e integridad de la membrana. El cambio respecto a la morfología normal se debe registrar en el informe del ensayo de forma descriptiva o numérica. Una forma útil de graduar la reactividad de las muestras de ensayo se da en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1 — Evaluación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos**

Grado	Reactividad	Condiciones de todos los cultivos
0	Ninguna	Gránulos intracitoplasmáticos discretos, ausencia de lisis celular, ausencia de reducción del crecimiento celular.
1	Ligera	No más del 20% de las células son redondas, débilmente unidas y sin gránulos intracitoplasmáticos, o muestran cambios morfológicos; están presentes células lisadas ocasionales;
2	Leve	No más del 50% de las células son redondas, desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos, lisis celular no extensa; no más del 50% de inhibición del crecimiento observable.
3	Moderada	No más del 70% de las capas celulares contienen células redondas o están lisadas; capas celulares no completamente destruidas, pero más del 50% de inhibición del crecimiento
4	Severa	Destrucción casi o totalmente completa de las capas celulares.



**Tabla 2 — Grados de reactividad para el ensayo en agar y de difusión en filtro y el ensayo por contacto directo**

Grado	Reactividad	Descripción de la zona de reactividad
0	Ninguna	Zona no detectable alrededor o debajo de la muestra
1	Ligera	Algunas células malformadas o degeneradas debajo de la muestra
2	Leve	Zona limitada al área debajo de la muestra
3	Moderada	Zona que se extiende hasta 1,0 cm del borde del tamaño de la muestra
4	Severa	Zona que se extiende más de 1,0 cm del borde del tamaño de la muestra

El método de evaluación y los resultados de la evaluación se deben incluir en el informe del ensayo.

Si se alcanza una graduación numérica superior a 2, basada en las tablas 1 y 2, se considera un efecto citotóxico.

**Evaluación cuantitativa:** Se mide la muerte celular, la inhibición del crecimiento celular, la proliferación celular o la formación de colonias. Se pueden cuantificar de forma objetiva el número de células, la cantidad de proteína, la liberación de enzimas, la liberación de colorante vital, la reducción de colorante vital o cualquier otro parámetro medible. La medición objetiva y la respuesta se deben registrar en el informe del ensayo.

La reducción superior al 30% de la viabilidad celular se considera un efecto citotóxico. Se deben justificar otros criterios, incluyendo puntos de corte diferentes o una proporción aceptable del resultado de ensayo comparado con el control, para líneas celulares alternativas o construcciones de tejido en multicapas. El criterio se debe justificar y documentar.

Los protocolos descritos en los anexos A y D se pueden utilizar para la determinación cuantitativa de la citotoxicidad de los extractos.

NOTA Los protocolos A y B han demostrado ser adecuados para productos químicos en estudios de validación internacionales y para equipos médicos en un ensayo por turno rotatorio internacional. Para los materiales citotóxicos, permiten la graduación del efecto citotóxico mediante el cálculo del valor  $IC_{50}$  (estimación de la concentración inhibitoria que afecta a la valoración final en cuestión en un 50%). Los anexos C y D describen otros protocolos ampliamente utilizados para la determinación cuantitativa de la citotoxicidad.

Para los métodos particulares de determinación de la citotoxicidad, puede ser necesario un control del cultivo celular del tiempo cero o basal.

**8.5.2** Se asegura que se procede con cuidado en la elección de los métodos de evaluación, dado que los resultados del ensayo pueden ser no válidos si la muestra de ensayo libera sustancias que interfieren con el sistema o la medición de ensayo.

Los materiales que pueden liberar formaldehído solamente se pueden ensayar de forma fiable cuando se evalúa la viabilidad celular.

**8.5.3** Si existen diferencias evidentes en el resultado de ensayo para los recipientes de cultivo de réplica, entonces el ensayo es o inapropiado o no válido. En este caso, el ensayo se debe repetir, o se puede utilizar una metodología alternativa.

**8.5.4** Si el control negativo, positivo o cualquier otro control (de referencia, del medio de cultivo, del blanco, del reactivo, etc.) no tienen la respuesta esperada en el sistema de ensayo, se repiten entonces todos los análisis.

## 9 Informe del Ensayo

El informe del ensayo debe incluir al menos los siguientes detalles:

- a) el nombre y la dirección de la instalación de ensayo;
- b) el nombre de la persona o personas que efectuaron el ensayo;
- c) las fechas de comienzo y terminación del ensayo;
- d) la descripción de la muestra;
- e) la línea celular, la justificación de la elección y la(s) fuente(s) celular(es);
- f) el nombre de la compañía y el número de lote del medio de cultivo, del suero y de los antibióticos, cuando se añaden;
- g) el método de análisis y la justificación;
- h) el procedimiento de extracción (si procede) y, si es posible, la naturaleza y concentración de la(s) sustancia(s) lixiviable(s);
- i) los controles negativo, positivo y otros;
- j) la respuesta celular y otras observaciones;
- k) cualquier otro dato pertinente necesario para la evaluación de los resultados.

## 9 Evaluación de los resultados

La evaluación global de los resultados se debe efectuar por una persona capaz de tomar decisiones informadas basadas en los datos del ensayo. Los datos de citotoxicidad se deben evaluar en relación con otros datos de biocompatibilidad y con la utilización prevista del producto.

La interpretación de los resultados del ensayo de citotoxicidad debe tener en cuenta la clasificación del producto dada en la Norma ISO 10993-1.

Si existe un efecto citotóxico, se puede efectuar una evaluación posterior, por ejemplo:

- a) ensayos adicionales (presencia/ausencia de suero, cambiando la concentración del suero en el medio de cultivo);
- b) análisis del extracto (por ejemplo, residuos de esterilización y de otros procesos de producción), cuando proceda;
- c) análisis de la respuesta en función de la concentración de las diluciones;
- d) caracterización química de los componentes lixiviables;
- e) otros procedimientos de ensayo.

Cualquier efecto citotóxico puede ser importante. Sin embargo, es principalmente una indicación del potencial de la toxicidad *in vitro* y no se puede determinar necesariamente que el producto sea inadecuado para una aplicación clínica dada basándose únicamente en los datos de toxicidad.

**Anexo A**  
**(informativo)**  
**Ensayo de citotoxicidad por captación de rojo neutro**  
**(Nru, neutral red uptake)**

### **A.1 Generalidades**

El protocolo de ensayo siguiente se basa en, y describe solamente, aquellas partes del anexo C de la referencia [1], que son pertinentes para este ensayo.

### **A.2 Procedimiento experimental**

#### **A.2.1 Procedimiento básico**

Se siembran células BALB/c 3T3 en placas de 96 pocillos y se mantienen en cultivo durante 24 h (~ 1 periodo de doblaje) para formar una monocapa semiconfluyente (véase la referencia [5] para una mayor información sobre los procedimientos de mantenimiento y cultivo celular). Se exponen entonces al compuesto de ensayo para un rango de concentraciones. Después de una exposición de 24 h, se determina la NRU para cada concentración de tratamiento y se compara con la determinada en los cultivos de control. Para cada tratamiento (es decir, concentración del producto químico de ensayo), se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento, si el extracto ejerce un efecto citotóxico sobre las células. Se calcula el  $IC_{50}$  (es decir, la concentración que produce una reducción del 50% de la NRU) a partir de la concentración-respuesta y se expresa como un porcentaje de dilución del extracto. El extracto puro se designa como extracto 100%.

#### **A. 2.2 Material**

##### **A.2.2.1 Línea celular**

Clon 31 de células BALB/c 3T3 (por ejemplo, ECACC86110401, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK; CCL-163, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) y JCRB 9005, preparado a partir de CCL-163 [ATCC], Human Science Research Resources Bank, Osaka, Japón.

##### **A.2.2.2 Equipo técnico**

**A.2.2.2.1 Incubador**, 37 °C, humidificado, 5% CO<sub>2</sub>/aire [de forma alternativa, en ausencia de un tampón adecuado en el medio de cultivo celular, se puede utilizar 7,5% CO<sub>2</sub>/aire porque las células son muy sensibles a los cambios de pH; sin embargo, en la mayoría de los laboratorios se utiliza más comúnmente 5%, si bien se añade HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1 -piperacilil-etanosulfónico].

**A.2.2.2.2 Cabina de flujo laminar**, norma: "peligro biológico".

**A.2.2.2.3 Baño maría**, 37 °C.

**A.2.2.2.4 Microscopio invertido de contraste de fases**

**A.2.2.2.5 Mechero de laboratorio**

**A.2.2.2.6 Centrifuga**, equipada opcionalmente con rotor de placa de microtitulación.

**A.2.2.2.7 Balanza de laboratorio**

**A.2.2.2.8 Fotómetro para placas de 96 pocillos**, equipado con filtro de 540 nm.

**A.2.2.2.9 Agitador**, para placas de microtitulación.

**A.2.2.2.10 Contador celular o hematocitómetro**

**A.2.2.2.11 Dispositivo pipeteador**

**A.2.2.2.12 Pipetas, pipetas de ocho canales, bloque de dilución**

**A.2.2.2.13 Criotubos**

**A.2.2.2.14 Matrices para el cultivo de tejidos, 80 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>.**

**A.2.2.2.15 Placas de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos**

**A.2.2.3 Productos químicos, medios y sueros**

**A.2.2.3.1 Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco s modification of eagle s médium*), sin L-glutamina.**

**A.2.2.3.2 L-glutamina, 200 mM, o glutamax.**

**A.2.2.3.3 Suero de ternero recién nacido (NBCS, *Newborn calf serum*).**

**IMPORTANTE** - No se debe utilizar suero bovino fetal (FCS, *Foetal calf serum*). El FCS causa una densidad óptica fuertemente reducida debido a la formación de vacuolas en las células.

Debido a la variabilidad del lote de NBCS, se verifica primero un lote respecto a las propiedades de estimulación del crecimiento utilizando células 3T3 (tiempo de doblaje comprendido entre 20 h y 25 h) y luego se reserva una cantidad suficiente de NBCS.

**A.2.2.3.4 Solución de Tripsina/EDTA**

**A.2.2.3.5 Solución salina tampón fosfato (PBS), sin Ca<sup>+2</sup> ni Mg<sup>+2</sup> (para tripsinización).**

**A.2.2.3.6 HEPES** (véase A.2.2.2.1).

**A.2.2.3.7 PBS, con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (para aclarado).**

**A.2.2.3.8 Solución de penicilina/estreptomina**

**A.2.2.3.9 Rojo neutro (RN)**

**A.2.2.3.10 Dimetil Sulfoxido (DMSO), grado analítico.**

**A.2.2.3.11 Etanol (ETOH)**, grado analítico.

**A.2.2.3.12 Ácido acético glacial**, grado analítico.

**A.2.2.3.13 Agua destilada o agua purificada adecuada para cultivo celular**

#### **A.2.2.4 Preparaciones**

##### **A.2.2.4.1 Generalidades**

Todas las soluciones (excepto la solución de reserva de RN, el medio RN y el RN desorción), instrumental de vidrio, etc., debe ser estéril y todos los procedimientos se deberían efectuar en condiciones asépticas y en el entorno estéril de una cabina de flujo laminar (norma de peligro biológico).

##### **A.2.2.4.2 Medios**

DMEM (tamponado con bicarbonato sódico) suplementado con (se especifican las concentraciones finales en DMEM):

###### **(A) Para congelación**

- 20% NBCS
- 7% a 10% DMSO

###### **(B) Para cultivos sistemáticos**

- 10% NBCS
- 4 mM L-glutamina o glutamax
- 100 UI/mL penicilina
- 100 µg/mL estreptomycinina
- 20 mM HEPES

###### **(C) Para el tratamiento con muestras de ensayo**

- 5% NBCS
- 4 mM glutamina o glutamax
- 100 UI/mL penicilina
- 100 µg/mL estreptomycinina
- 20 mM HEPES

Los medios completos se deberían mantener a 4 °C y se deberían almacenar durante no más de dos semanas.

La concentración del suero del medio de tratamiento se reduce al 5%, dado que las proteínas del suero pueden enmascarar la toxicidad de la sustancia de ensayo. El suero no se puede excluir totalmente porque el crecimiento celular resulta marcadamente reducido en su ausencia.

#### A.2.2.4.3 Solución de reserva de rojo neutro (RN)

- 0,4 g colorante RN
- 100 mL H<sub>2</sub>O

Se prepara antes de utilizarlo y se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente hasta un máximo de dos meses. Se pueden utilizar soluciones de reserva de rojo neutro preparadas comercialmente hasta su fecha de caducidad cuando se almacenan de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta.

#### A.2.2.4.4 Medio rojo neutro (RN)

- 1 mL Solución de reserva de RN
- 79 mL DMEM

El medio RN se debería incubar durante la noche anterior a 37 °C y se debería centrifugar a 600 g durante 10 min (para eliminar los cristales de RN) antes de añadir las células. Se pueden utilizar procedimientos alternativos (por ejemplo, filtración milipore) siempre que esté garantizado que el medio RN esté exento de cristales. Las alícuotas del medio RN se deberían mantener a 37 °C (por ejemplo, en un baño maría) antes de su adición a las células. Se deberían utilizar antes de transcurridos 30 min desde su preparación y antes de transcurridos 15 min después de retirarlas de su almacenamiento a 37 °C.

#### A.2.2.4.5 Solución de etanol/ácido acético (RN desorción)

- 1 % solución de ácido acético glacial
- 50% etanol
- 49% H<sub>2</sub>O

Se prepara inmediatamente antes de utilizarla. No se debe almacenar durante más de 1 h.

#### A.2.2.4.6 Preparación del extracto de la muestra

Las muestras se extraen de acuerdo con la Norma NC ISO 10993-12.

### A.2.3 Métodos

#### A.2.3.1 Generalidades

Para los métodos de cultivo celular sistemáticos, véase el anexo C de la referencia [1].

#### A.2.3.2 Verificación de la calidad del análisis (CA); control positivo (PC)

Se debe incluir un control positivo en cada ensayo de citotoxicidad.

Referente a los muchos productos químicos respaldados por un historial suficiente o por ensayos repetidos intralaboratorio e interlaboratorios, el lauril sulfato sódico (SLS, n° CAS 151-21-3) es uno de los más frecuentemente ensayados, y se recomienda por tanto como un control positivo. Se recomienda que el SLS se ensaye en una escala de cuatro concentraciones: 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,2 mg/mL

El valor medio histórico,  $IC_{50}$ , del SLS (Spielman et. al., 1991<sup>[10]</sup>) es 0,093 mg/mL

El IC (intervalo de confianza) del 95% es 0,070 mg/mL a 0,116 mg/mL

Un ensayo cumple los criterios de aceptación, si el  $IC_{50}$  para el SLS está dentro del IC del 95%.

Se recomienda la utilización de materiales de referencia para el control positivo y el control negativo [por ejemplo, ZDEC y ZDBC (véase la nota al pie 1 en la página 2 y los apartados 3.2 y 3.4)].

#### **A.2.3.3 Verificación de la calidad del análisis (CA); blanco**

El valor absoluto (no relativo al blanco) de la densidad óptica ( $OD_{540}$  del NRU) obtenido en el blanco sin tratar indica si las  $1 \times 10^4$  células sembradas por pocillo han crecido exponencialmente con un tiempo de doblaje normal durante los dos días del análisis.

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio de la  $OD_{540}$  del blanco es  $> 0,3$ . Para verificar la existencia de errores sistemáticos durante el sembrado celular, los blancos se tratan en condiciones de extracción (véase A.2.2.4.6) y se colocan tanto al lado izquierdo (fila 2) como al lado derecho (fila 11) de la placa de 96 pocillos (las filas 1 y 12 no se deben utilizar; para la disposición de las placas, véase el anexo E en la referencia [1]).

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio izquierdo y derecho de los blancos no difiere en más del 15% del valor medio de todos los blancos.

Las verificaciones de los errores de sembrado celular se pueden efectuar también examinando cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que la cantidad de células es coherente. La evaluación microscópica hace innecesaria la utilización de dos filas de blancos.

#### **A.2.3.4 Verificación de la calidad de la concentración-respuesta**

El  $IC_{50}$  derivado a partir de la concentración-respuesta debería estar refrendado por al menos dos, o si es posible, tres respuestas entre la inhibición 10% y 90% de la NRU. Si este no es el caso, y el factor de progresión de la concentración se puede reducir fácilmente, se rechaza el experimento y se repite con un factor de progresión más pequeño.

#### **A.2.3.5 Concentraciones de los extractos de la muestra de ensayo**

##### **A.2.3.5.1 Experimento de búsqueda del rango**

Se ensayan ocho concentraciones del extracto de la muestra diluyendo la solución de reserva con un factor constante, que cubra un rango grande, por ejemplo, intervalos de 0,5 log. Si la reducción de la viabilidad del cultivo celular con la concentración más alta del extracto de la muestra es 30% o inferior, entonces el material se ha de considerar no citotóxico y no es necesario ningún experimento posterior.

##### **A.2.3.5.2 Experimento principal**

Dependiendo de la pendiente de la curva de concentración-respuesta estimada a partir de la búsqueda del rango, el factor de dilución/progresión en la serie de la concentración del experimento principal debería ser más pequeño (por ejemplo,  $610 = 1,47$ ). Se intenta cubrir

el rango de concentración pertinente (efecto entre 10% y 90%) con al menos tres puntos de un efecto graduado, evitando demasiadas concentraciones no citotóxicas y/o 100% citotóxicas.

#### A.2.3.6 Procedimiento del ensayo

**IMPORTANTE - Después de la descongelación a partir de la solución de reserva, se efectúan dos o tres pases antes de utilizar las células en el ensayo.**

La tabla A.1 muestra el flujo de trabajo del procedimiento de ensayo.

##### 1<sup>er</sup> día

- Se prepara una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/mL en el medio de cultivo. Utilizando una pipeta multicanal, se dispensan 100  $\mu$ l del medio de cultivo solamente en los pozos periféricos de una placa de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos (= blancos, véase el apéndice E en la referencia [1]). En los pocillos restantes, se dispensan 100  $\mu$ l de una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/mL ( $1 \times 10^4$  células/pocillo). Se prepara una placa por extracto de la muestra a ensayar, una placa para el control positivo y una placa para el material de control negativo si existe disponible.
- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%) de forma que las células formen una monocapa semiconfluente. Este periodo de incubación asegura la recuperación de las células, y su adherencia y progresión a la fase de crecimiento exponencial.
- Se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que el crecimiento celular es relativamente homogéneo en toda la placa de microtitulación. Esta verificación se efectúa para identificar errores experimentales.

##### 2<sup>o</sup> día

- Después de la incubación durante 24 h, se aspira el medio de cultivo de los pocillos.
- En cada pocillo, se añaden 100  $\mu$ l de medio de tratamiento conteniendo ya sea la concentración apropiada del extracto de la muestra, o el control negativo, o el control positivo o nada excepto el vehículo (blanco).
- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90 %).

##### 3<sup>er</sup> día

Después del tratamiento durante 24 h, se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para identificar los errores sistemáticos de siembra celular y las características del crecimiento de las células de control y de las células tratadas. Se registran los cambios en la morfología celular debidos a los efectos citotóxicos del extracto de la muestra de ensayo, pero no se utilizan estos registros para el cálculo de la dosis tolerable más alta (HTD) ni ninguna otra medida cuantitativa de la citotoxicidad. Las características no deseables del crecimiento de las células de control pueden indicar un error experimental y pueden ser causa del rechazo del análisis.



La medición de la NRU se basa en la de Ellen Borenfreund (Borenfreund and Puerner<sup>[3]</sup>). La captación de RN en los lisosomas/endosomas y vacuolas de células vivas se utiliza como una indicación cuantitativa del número y viabilidad de las células.

- Se lavan las células con 150 µl de PBS precalentado. Se elimina la solución de lavado mediante golpecitos suaves. Se añaden 100 µl de medio RN y se incuba a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> durante 3 h.
- Después de la incubación, se elimina el medio RN, y se lavan las células con 150 µl de PBS.
- Se decanta y se absorbe el PBS totalmente con un secante (opcionalmente, se centrifuga la placa invertida).
- Se añaden 150 µl de solución de RN desorción (ETOH/ácido acético) a todos los pocillos, incluidos los blancos.
- Se agita la placa de microtitulación rápidamente en un agitador de placa de microtitulación durante 10 min hasta que el RN se ha extraído de las células y forma una solución homogénea.
- Se mide la absorción de la solución coloreada resultante a 540 nm en un lector de placa de microtitulación, utilizando los blancos como referencia. Se guardan los datos sin procesar en un formato de archivo apropiado (por ejemplo, ASCII, TXT, XLS) para el análisis posterior de la concentración-respuesta y el cálculo del  $IC_{50}$ .

#### A.2.4 Análisis de los datos

Se efectúa un cálculo de la viabilidad celular expresada como la NRU para cada concentración del extracto de la muestra de ensayo utilizando la media de las NRU de los seis valores de réplica para cada concentración de ensayo. Este valor se compara con la NRU media de todos los valores de los blancos (si los blancos han cumplido los criterios de aceptación). La viabilidad celular relativa se expresa entonces como un porcentaje del blanco sin tratar. Si se puede lograr, las ocho concentraciones de cada compuesto ensayado deberían cubrir el rango desde la ausencia de efecto hasta la inhibición total de la viabilidad celular.

Tabla A.1 — Flujo de trabajo del ensayo de citotoxicidad 3T3 NRU

Tiempo h	Procedimiento
00:00	Se siembran placas de 96 pocillos: $1 \times 10^4$ células/100 $\mu$ l de medio de cultivo DMEM/pocillo Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 22 h a 24 h)
24:00	Se retira el medio de cultivo
24:00	Se trata con ocho concentraciones del extracto de la muestra de ensayo en medio de tratamiento (100 $\mu$ l) (blanco sin tratar = medio de tratamiento) Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 24 h)
48:00	Evaluación microscópica de las alteraciones morfológicas Se retira el medio de tratamiento Se lava una vez con 150 $\mu$ l de PBS Se añaden 100 $\mu$ l del medio RN Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 3 h)
51:00	Se desecha el medio RN. Se lava una vez con 150 $\mu$ l de PBS. Se añaden 150 $\mu$ l del fijador de desorción del RN (solución de ETOH/ácido acético)
51:40	Se agita la placa durante 10 min
51:50	Se detecta la absorción del RN a 540 nm (es decir, la viabilidad de las células)

Si la viabilidad relativa de las células para la concentración más alta del extracto de la muestra (extracto 100%) es inferior al 70% de la del grupo control, la concentración de un producto químico de ensayo que refleje una inhibición del 50% de la viabilidad celular (es decir, el  $IC_{50}$ ) se determina a partir de la concentración-respuesta. Esto se puede hacer ya sea aplicando:

- un método de ajuste gráfico manual,

Se recomienda la utilización de papel de probabilidad con escalas de "abscisas(X) = log" y "ordenadas (Y) = probit" porque en la mayoría de los casos la función concentración - respuesta resultará casi lineal en el rango pertinente. Se podría utilizar también papel semilogarítmico para esta técnica.

o

- cualquier procedimiento de regresión no lineal (preferiblemente una función de Hill<sup>4</sup>) o una regresión logística a los datos de concentración-respuesta.

Antes de utilizar el  $IC_{50}$  para cálculos posteriores, se debería verificar de forma apropiada la calidad del ajuste.

Si la viabilidad relativa de las células para la concentración más alta del extracto de la muestra (extracto 100%) es > 70% de la del grupo control, entonces el material se debe considerar no citotóxico.

<sup>4</sup> Las funciones de Hill son monótonas y de forma sigmoideal y representan un modelo aceptable para muchas curvas dosis-respuesta.

**Anexo B  
(informativo)  
Ensayo de Citotoxicidad con formación de Colonias**

**B.1 Generalidades**

El protocolo de ensayo se basa en la parte I del ensayo de citotoxicidad de las directrices japonesas para ensayos biológicos básicos de materiales médicos y equipos médicos, véase la referencia [2].

NOTA El protocolo a continuación describe solamente aquellas secciones de la parte I pertinentes al ensayo de citotoxicidad.

**B.2 Procedimiento experimental****B.2.1 Procedimiento básico**

Se siembran células V79 en placas de seis pocillos y se mantienen en cultivo durante 24 h para comenzar el crecimiento en una fase logarítmica. Se exponen entonces al compuesto de ensayo para un rango de concentraciones. Se incuban durante seis días para formar colonias suficientemente grandes para el recuento. Las colonias se fijan con metanol, se tiñen con solución de Giemsa, y se efectúa su recuento. Si el extracto exhibe un efecto citotóxico sobre las células, se calcula el  $IC_{50}$  (la concentración que inhibe la eficacia de plaqueo al 50%) y se expresa como un porcentaje del extracto.

**B.2.2 Material****B.2.2.1 Línea celular**

Células V79 (JCRB 0603, Human Science Research Resources Bank, Osaka, Japón, disponibles en otros bancos de células de EEUU y de la UE).

NOTA Las células V79 se recomiendan porque forman colonias grandes y transparentes.

**B.2.2.2 Equipo técnico**

**B.2.2.2.1 Incubador**, 37 °C, humidificado, 5% CO<sub>2</sub>/aire

**B.2.2.2.2 Cabina de flujo laminar**, norma: "peligro biológico".

**B.2.2.2.3 Baño maría**, 37 °C.

**B.2.2.2.4 Microscopio invertido de contraste de fases**

**B.2.2.2.5 Estereomicroscopio**

**B.2.2.2.6 Mechero de laboratorio**

**B.2.2.2.7 Balanza de laboratorio**

**B.2.2.2.8 Contador celular o hematocitómetro**

**B.2.2.2.9 Dispositivo pipeteador**

**B.2.2.2.10 Pipetas**

**B.2.2.2.11 Matracas para el cultivo de tejidos, 75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> o plato para el cultivo de tejidos, 100 mm de diámetro.**

**B.2.2.2.12 Placas de microtitulación y cultivo celular de seis pocillos**

**B.2.2.3 Productos químicos, medios y sueros**

**B.2.2.3.1 Medio esencial mínimo de Eagle (MEM),** conteniendo solución salina equilibrada de Eagle.

**B.2.2.3.2 Suero bovino fetal (FCS)**

NOTA Debido a la variabilidad del FCS, se verifica primero un lote respecto a las propiedades de estimulación del crecimiento utilizando células V79 y luego se reserva una cantidad suficiente de FCS.

**B.2.2.3.3 Solución de Tripsina/EDTA**

**B.2.2.3.4 Solución salina tampón fosfato (PBS),** sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (para tripsinización).

**B.2.2.3.5 Solución de penicilina/estreptomicina**

**B.2.2.3.6 Dimetil Sulfoxido (DMSO),** grado analítico.

**B.2.2.3.7 Metanol,** grado analítico.

**B.2.2.3.8 Solución de Giemsa**

**B.2.2.3.9 Solución tampón fosfato**

**B.2.2.3.10 Agua destilada o agua purificada adecuada para cultivo celular**

**B.2.2.3.11 Bicarbonato sódico**

**B.2.2.3.12 L-glutamina**

**B.2.2.3.13 Solución de MEM con aminoácidos no esenciales**

**B.2.2.3.14 Piruvato sódico, 100 mM**

**B.2.2.4 Preparaciones**

**B.2.2.4.1 Generalidades**

Todas las soluciones (excepto la solución de Giemsa), instrumental de vidrio, etc., deben ser estériles y todos los procedimientos se deberían efectuar en condiciones asépticas y en el entorno estéril de una cabina de flujo laminar (norma de peligro biológico).

**B.2.2.4.2 Medios**

1 000 mL de MEM de Eagle suplementado de la siguiente forma:

(A) Para la congelación y el cultivo sistemático, se utiliza el medio con 10% de FCS (MEM10)

- 111 mL FCS
- 2,2 g bicarbonato sódico
- 0,292 g L-glutamina

(B) Para la extracción y el tratamiento, se utiliza el medio con 5% de FCS (MEM 05)

- 53,5 mL FCS
- 5 mL Solución de MEM con aminoácidos no esenciales
- 10 mL Piruvato sódico, 100 mM
- 0,292 g L-glutamina
- 2,2 g bicarbonato sódico

Los medios completos se deberían mantener a 4 °C y se deberían almacenar durante un tiempo no superior a un mes.

La concentración del suero del medio de tratamiento se reduce al 5%, dado que las proteínas del suero pueden enmascarar la toxicidad de la sustancia de ensayo. El suero no se puede excluir totalmente porque el crecimiento celular resulta marcadamente reducido en su ausencia. Se puede añadir una cantidad apropiada de antibióticos en los medios arriba indicados siempre que no afecte adversamente el análisis.

#### **B.2.2.4.3 Solución de Giemsa 5%**

- 5 mL Solución de Giemsa
- 95 mL solución tampón fosfato, cualquier clase, pH comprendido entre 6,5 y 7,5

Se prepara inmediatamente antes de utilizarla.

#### **B.2.2.4.4 Preparación del extracto de la muestra**

Las muestras se extraen de acuerdo con la Norma ISO 10993-12, pero se recomienda que la proporción de extracción del área superficial al volumen de extracción se 0,1 g/mL

Véanse las referencias [6], [7] y [11].

El extracto se separa por decantación, siendo el extracto 100% designado. El extracto 100% se diluye con medio MEM05 para dar los diversos porcentajes del extracto diluido.

### **B.2.3 Métodos**

#### **B.2.3.1 Generalidades**

Para los métodos sistemáticos de cultivo celular, véase el anexo C de la referencia [1].

#### **B.2.3.2 Verificación de la calidad del análisis (CA); control positivo (PC) y control negativo (NC)**

Se deben incluir controles positivos y negativos en cada ensayo de citotoxicidad. Se recomienda la utilización de materiales de referencia para el control positivo y el control negativo, por ejemplo, ZDEC y ZDBC (véase la nota al pie 1 en la página 9).

Se deberían utilizar los criterios de aceptación siguientes para ZDEC y ZDBC:

- a) el  $IC_{50}$  para ZDEC no debería ser superior a 7%;
- b) el  $IC_{50}$  para ZDBC no debería ser superior a 80%.

### **B.2.3.3 Verificación de la calidad del análisis (CA); blanco**

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si la media del número de colonias en el blanco es al menos 70% del número de células sembradas por pocillo.

### **B.2.3.4 Verificación de la calidad de la concentración-respuesta**

El  $IC_{50}$  derivado a partir de la concentración-respuesta debería estar refrendado por al menos dos, o si es posible, tres respuestas entre el 10% y 90% de la inhibición del control. Si este no es el caso, y el factor de progresión de la concentración se puede reducir fácilmente, se rechaza el experimento y se repite con un factor de progresión más pequeño.

### **B.2.3.5 Concentraciones de los extractos de la muestra de ensayo**

#### **B.2.3.5.1 Experimento de búsqueda del rango**

Se ensayan cuatro concentraciones del extracto de la muestra diluyendo la solución de reserva con un factor constante, que cubra un rango grande, por ejemplo,  $1 > 1/10 > 1/100 > 1/1\ 000$ . Si la reducción de la viabilidad del cultivo celular con la concentración más alta del extracto de la muestra es 30% o inferior, entonces el material se ha de considerar no citotóxico y no es necesario ningún experimento principal posterior.

#### **B.2.3.5.2 Experimento principal**

Dependiendo de la pendiente de la curva de concentración-respuesta estimada a partir de la búsqueda del rango, el factor de dilución/progresión en la serie de la concentración del experimento principal debería ser más pequeño. Se intenta cubrir el rango de concentración pertinente (efecto entre 10% y 90%) con al menos tres puntos de un efecto graduado, evitando demasiadas concentraciones no citotóxicas y/o 100% citotóxicas.

#### **B.2.3.6 Procedimiento del ensayo**

**IMPORTANTE - Después de la descongelación a partir de la solución de reserva, se efectúan dos o tres pases antes de utilizar las células en el ensayo.**

##### **1<sup>er</sup> día**

Se prepara una suspensión celular de 33,3 células/mL en el medio de cultivo MEM05. Se colocan 3 mL de la suspensión en cada pocillo de una placa de seis pocillos.

##### **2<sup>o</sup> día**

Después de la incubación durante 24 h, se aspira el medio de cultivo de cada pocillo. Se añaden 2 mL del extracto 100% o del extracto diluido preparado con medio MEM05. Cada concentración se ensaya por triplicado. Se incuban en el Incubador durante otros seis días.

**8º día**

Se aspira el medio de tratamiento de cada pocillo, se aclara el pocillo con PBS, se fijan las colonias con metanol, y se tiñen con solución de Giemsa 5%. Se efectúa el recuento del número de colonias en cada pocillo.

**B.2.3.7 Presentación de los resultados**

- Se observan los pocillos utilizando un estereomicroscopio y se cuenta el número de colonias que contengan 50 o más células en cada pocillo.
- Se registra el número de colonias en un pocillo.
- Se calcula la media del número de colonias para cada concentración del extracto.
- Se divide este número por el correspondiente al del grupo de control y se expresa el cociente (eficacia de plaqueo: PE) como un porcentaje.
- Si la eficacia de plaqueo para la concentración más alta del extracto de la muestra (extracto 100%) es inferior a 70% del grupo de control, el material se debe considerar potencialmente citotóxico y la citotoxicidad de las muestras de ensayo se expresa con el valor  $IC_{50}$  como un porcentaje.
- El  $IC_{50}$  (la concentración que inhibe la PE al 50%) se calcula como la dosis con una tasa de supervivencia relativa del 50% que se calcula a partir de la línea que pasó a través de una dosis con tasa de supervivencia superior y una dosis con tasa de supervivencia inferior al 50%.
- Si la eficacia de plaqueo es  $> 70\%$  del grupo control, el material se debe considerar no citotóxico.

NOTA Cuando la eficacia de plaqueo a la concentración más alta está comprendida entre el 50% y el 70%, podría no ser práctico calcular el valor  $IC_{50}$  sobre la concentración más alta.

**B.2.4 Informe del ensayo**

El informe del ensayo se debe preparar de acuerdo con el capítulo 9; además, se debe dar lo siguiente:

- a) PE del control en las condiciones dadas;
- b) todos los datos del ensayo, incluyendo el número de colonias, las curvas de inhibición de la formación de colonias y, si es posible, los valores  $IC_{50}$  obtenidos para las muestras del ensayo.

**Anexo C  
(informativo)  
Ensayo de Toxicidad por MTT**

**C.1 Generalidades**

El protocolo de ensayo siguiente se basa en la medición de la viabilidad celular a través de su actividad metabólica, véase la referencia [9]. El MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) soluble en agua de color amarillo se reduce metabólicamente en las células viables a un formazán azul-violeta insoluble. El número de células viables se correlaciona con la intensidad del color determinada por mediciones fotométricas después de disolver el formazán en alcohol.

**C.2 Procedimiento experimental****C.2.1 Procedimiento básico**

Se siembran células L929 en placas de 96 pocillos y se mantienen en cultivo durante 24 h (~ 1 periodo de doblaje) para formar una monocapa semiconfluyente (véase la referencia [5] para mayor información sobre los procedimientos de mantenimiento y cultivo celular). Se exponen entonces al compuesto de ensayo para un rango de concentraciones. Después de la exposición durante 24 h, la formación de formazán se determina para cada concentración de tratamiento y se compara con aquella determinada en los cultivos de control. Se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento para cada tratamiento.

**C.2.2 Material****C.2.2.1 Línea celular**

Células L-929 (clon 929 de la NCTC: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC No. 88102702, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK). Los cultivos celulares deben estar exentos de micoplasma.

**C.2.2.2 Equipo técnico**

**C.2.2.2.1 Incubador**, 37 °C, humidificado, 5% CO<sub>2</sub>/aire.

**C.2.2.2.2 Cabina de flujo laminar**, norma: "peligro biológico".

**C.2.2.2.3 Baño maría**, 37 °C.

**C.2.2.2.4 Microscopio invertido de contraste de fases**

**C.2.2.2.5 Mechero de laboratorio**

**C.2.2.2.6 Centrífuga**, equipada opcionalmente con rotor de placa de microtitulación.

**C.2.2.2.7 Balanza de laboratorio**

**C.2.2.2.8 Fotómetro para placas de 96 pocillos**, equipado con filtro de 570 nm (referencia 650 nm).



- C.2.2.2.9 Agitador**, para placas de microtitulación.
- C.2.2.2.10 Contador celular o hematocitómetro**
- C.2.2.2.11 Dispositivo pipeteador**
- C.2.2.2.12 Pipetas, pipetas de ocho canales, bloque de dilución**
- C.2.2.2.13 Criotubos**
- C.2.2.2.14 Matraces para el cultivo de tejidos o placas Petri para el cultivo de tejidos**
- C.2.2.2.15 Placas de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos**
- C.2.2.3 Productos químicos, medios y sueros**
  - C.2.2.3.1 Medio esencial mínimo de Eagle (MEM)**, sin rojo fenol, sin glutamina y sin  $\text{NaHCO}_3$ .
  - C.2.2.3.2 Suero bovino fetal (FCS)**
  - C.2.2.3.3 Solución de Tripsina/EDTA**
  - C.2.2.3.4 Solución salina tampón fosfato (PBS)**
  - C.2.2.3.5 MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)**
  - C.2.2.3.6 Bopropanol**, grado analítico.
- C.2.2.4 Preparaciones**
  - C.2.2.4.1 Generalidades**

Todas las soluciones, instrumental de vidrio, etc., deben ser estériles y todos los procedimientos se deberían efectuar en condiciones asépticas y en el entorno estéril de una cabina de flujo laminar (norma de peligro biológico).

#### **C.2.2.4.2 Medios**

MEM (tamponado con bicarbonato sódico) suplementado con (se especifican las concentraciones finales en MEM):

##### (A) Para congelación

- 20% FCS
- 7% a 10% DMSO

##### (B) Para cultivos sistemáticos

- 10 % FCS
- 4 mM glutamina o glutamax
- 100 UI/mL penicilina
- 100 g/mL estreptomicina

Los medios completos se deberían mantener a 4 °C y se deberían almacenar durante no más de dos semanas.

#### C.2.2.4.3 Solución de MTT

El MTT se prepara recientemente disolviéndolo en MEM sin suplementos y sin rojo fenol a una concentración de 1 mg/mL. La solución se esteriliza por filtración utilizando filtros de jeringa (tamaño de poro < 0,22 µm). La solución se debería utilizar el mismo día.

#### C.2.2.4.4 Preparación del extracto de la muestra

Las muestras se extraen de acuerdo con la Norma ISO 10993-12.

### C.2.3 Métodos

#### C.2.3.1 Generalidades

Para los métodos de cultivo celular sistemáticos, véase el anexo C de la referencia [1].

#### C.2.3.2 Verificación de la calidad del análisis (CA); control positivo (PC) y control negativo (NC)

Se deberían incluir controles positivos y negativos en cada ensayo de cito toxicidad. Se recomienda la utilización de materiales de referencia para el control positivo y el control negativo, por ejemplo, ZDEC y ZDBC (véase la nota al pie 1 en la página 9).

#### C.2.3.3 Verificación de la calidad del análisis (CA); blanco

El valor absoluto de la densidad óptica,  $OD_{570}$ , obtenido en el blanco sin tratar indica si las  $1 \times 10^4$  células sembradas por pocillo han crecido exponencialmente con un tiempo de doblaje normal durante los dos días del análisis.

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio de la  $OD_{570}$  del blanco es  $> 0,2$ . Para verificar la existencia de errores sistemáticos durante el sembrado celular, los blancos se colocan tanto al lado izquierdo (fila 2) como al lado derecho (fila 11) de la placa de 96 pocillos (la fila 1 y la fila 12 no se deben utilizar; para la disposición de las placas, véase el anexo E en la referencia [1]).

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio izquierdo y derecho de los blancos no difiere en más del 15% del valor medio de todos los blancos.

Las verificaciones de los errores de sembrado celular se pueden efectuar también examinando cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que la cantidad de células es coherente. La evaluación microscópica hace innecesaria la utilización de dos filas de blancos.

#### C.2.3.4 Procedimiento de ensayo

**IMPORTANTE - Después de la descongelación a partir de la solución de reserva, se efectúan dos o tres pases antes de utilizar las células en el ensayo.**

La tabla C.1 muestra el flujo de trabajo del procedimiento de ensayo.

#### 1er día después del crecimiento de las células a partir de la solución de reserva

- Los cultivos celulares se retiran de los matraces de cultivo por digestión enzimática (tripsina/EDTA) y la suspensión celular se centrifuga (200 g, 3 min). Las células se resuspenden entonces en medio de cultivo y la suspensión celular se ajusta a una

densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL Utilizando una pipeta multicanal, se dispensan 100 µl del medio de cultivo solamente (blancos) en los pozos periféricos de una placa de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos (= blancos, véase el apéndice E en la referencia [1]). En los pocillos restantes, se dispensan 100 µl de una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/mL (=  $1 \times 10^4$  células/pocillo).

- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%) de forma que las células formen una monocapa semiconfluente. Este periodo de incubación asegura la recuperación de las células, y su adherencia y progresión a la fase de crecimiento exponencial.
- Se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que el crecimiento celular es relativamente homogéneo en toda la placa de microtitulación. Esta verificación se efectúa para identificar errores experimentales.

### **2º día Después de la incubación durante 24 h, se aspira el medio de cultivo de los pocillos.**

- En cada pocillo, se añaden 100 µl de medio de tratamiento conteniendo ya sea la concentración apropiada del extracto de la muestra, o el control negativo, o el control positivo o nada excepto el blanco. Se deberían ensayar al menos cuatro concentraciones diferentes del extracto del artículo de ensayo o del extracto del control positivo. La concentración más alta utilizada debería ser el extracto 100% y las otras concentraciones quedarán espaciadas adecuadamente dentro de un único rango logarítmico. Para el control negativo, se debería ensayar solamente el extracto 100%. El medio de cultivo se debería utilizar como blanco.
- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%).

### **3º día**

- Después del tratamiento durante 24 h, se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para identificar los errores sistemáticos de siembra celular y las características del crecimiento de las células de control y de las células tratadas. Se registran los cambios en la morfología celular debidos a los efectos citotóxicos del extracto de la muestra de ensayo, pero no se utilizan estos registros para ninguna medida cuantitativa de la cito toxicidad. Las características no deseables del crecimiento de las células de control pueden indicar un error experimental y pueden ser causa del rechazo del análisis.
- Después del examen de las placas, se retira con cuidado el medio de cultivo de las placas. Ésta es una etapa importante, porque los productos químicos reductores en el extracto pueden también reducir al MTT, produciendo resultados de falsos negativos. Se añaden entonces 50 µl de la solución de MTT (véase C.2.2.4.3) a cada pocillo de ensayo y las placas se incuban adicionalmente durante 2 h en la incubadora a 37 °C. Entonces se decanta la solución de MTT y se añaden 100 µl de isopropanol en cada pocillo. Se hace oscilar suavemente esta placa y se transfiere posteriormente a un lector de microplacas equipado con un filtro de 570 nm para leer la absorbancia (longitud de onda para la referencia 650 nm).

Tabla C.1 — Flujo de trabajo del ensayo de citotoxicidad MTT

Tiempo h	Procedimiento
00:00	Se siembran placas de 96 pocillos: $1 \times 10^4$ células/100 $\mu$ l de medio de cultivo MEM/pocillo. Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 22 h a 26 h)
24:00	Se retira el medio de cultivo
24:00	Se trata con > 4 concentraciones del extracto de la muestra de ensayo en medio de tratamiento (100 $\mu$ l) (blanco sin tratar = medio de tratamiento). Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 24 h)
48:00	Evaluación microscópica de las alteraciones morfológicas. Se retira el medio de cultivo. Se añaden 50 $\mu$ l de la solución de MTT. Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 2 h)
51:00	Se decanta la solución de MTT. Se añaden 100 $\mu$ l de isopropanol a cada pocillo. Se hace oscilar suavemente la placa
51:30	Se detecta la absorción a 570 nm (la referencia a 650 nm)

#### C.2.4 Registro de los datos

Los datos generados se registrarán en el archivo de datos sin procesar. Los resultados se presentarán en forma tabular, incluyendo los grupos experimentales con el artículo de ensayo, controles negativos, blancos y positivos.

#### C.2.5 Análisis de los datos

Un descenso en el número de células vivas da como resultado un descenso en la actividad metabólica en la muestra. Este descenso se correlaciona directamente con la cantidad de formazán azul-violeta formado, monitorizado por la densidad óptica a 570 nm. Para calcular la reducción de la viabilidad comparada con el blanco, se utiliza la ecuación

(C.1):

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

Donde

OD<sub>570e</sub> es el valor medio de la densidad óptica medida de los extractos 100% de la muestra de ensayo;

OD<sub>570b</sub> es el valor medio de la densidad óptica medida de los blancos.

Cuanto más bajo es el valor de la Viab. %, tanto mayor es el potencial citotóxico del artículo de ensayo.

Si la viabilidad se reduce < 70% respecto al blanco, el artículo objeto del ensayo tiene potencial citotóxico. El extracto 50% de la muestra de ensayo debería tener al menos una viabilidad igual o superior que la del extracto 100%; de lo contrario el ensayo se debería repetir.

**Anexo D  
(informativo)  
Ensayo de Citotoxicidad XTT**

### **D.1 Generalidades**

El protocolo de ensayo siguiente se basa en la medición de la viabilidad de células basada en las deshidrogenasas mitocondriales, véase la referencia [9].

El XTT (2,3-bis (2 metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilina) se reduce metabólicamente en las células viables a un formazán soluble en agua. El número de células viables se correlaciona con la intensidad del color determinada por mediciones fotométricas.

### **D.2 Procedimiento experimental**

#### **D.2.1 Procedimiento básico**

Se siembran células L929 en placas de 96 pocillos y se mantienen en cultivo durante 24 h (~ 1 periodo de doblaje) para formar una monocapa semiconfluyente (véase la referencia [5] para una mayor información sobre los procedimientos de mantenimiento y cultivo celular). Se exponen entonces al compuesto de ensayo para un rango de concentraciones. Después de la exposición durante 24 h, la formación de formazán se determina para cada concentración de tratamiento y se compara con aquélla determinada en los cultivos de control. Se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento para cada tratamiento.

#### **D.2.2 Material**

##### **D.2.2.1 Línea celular**

Células L929 (clon 929 de la NCTC: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC No. 88102702, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK). Los cultivos celulares tienen que estar exentos de micoplasma.

##### **D.2.2.2 Equipo técnico**

**D.2.2.2.1 Incubadora**, 37 °C, humidificado, 5% CO<sub>2</sub>/aire.

**D.2.2.2.2 Cabina de flujo laminar**, norma: "peligro biológico".

**D.2.2.2.3 Baño maría**, 37 °C.

**D.2.2.2.4 Microscopio invertido de contraste de fases**

**D.2.2.2.5 Mechero de laboratorio**

**D.2.2.2.6 Centrífuga**, equipada opcionalmente con rotor de placa de microtitulación.

**D.2.2.2.7 Balanza de laboratorio**

**D.2.2.2.8 Fotómetro para placas de 96 pocillos**, equipado con filtro de 450 nm (referencia 650 nm).

**D.2.2.2.9 Agitador**, para placas de microtitulación.

**D.2.2.2.10 Contador celular o hematocitómetro**

**D.2.2.2.11 Dispositivo pipeteador**

**D.2.2.2.12 Pipetas, pipetas de ocho canales, bloque de dilución**

**D.2.2.2.13 Criotubos**

**D.2.2.2.14 Matraces para el cultivo de tejidos o placas Petri para el cultivo de tejidos**

**D.2.2.2.15 Placas de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos**

**D.2.2.3 Productos químicos, medios y sueros**

**D.2.2.3.1 Medio esencial mínimo de Eagle (MEM)**, sin rojo fenol, sin glutamina y sin  $\text{NaHCO}_3$ .

**D.2.2.3.2 Suero bovino fetal (FCS)**

**D.2.2.3.3 Solución de Tripsina/EDTA**

**D.2.2.3.4 Solución salina tampón fosfato (PBS)**

**D.2.2.3.5 XTT** (sal interna de 2,3-bis (2 metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilina)

**D.2.2.3.6 PMS** (metosulfato de fenacina)

**D.2.2.4 Preparaciones**

**D.2.2.4.1 Generalidades**

Todas las soluciones, instrumental de vidrio, etc., deben ser estériles y todos los procedimientos se deberían efectuar en condiciones asépticas y en el entorno estéril de una cabina de flujo laminar (norma de peligro biológico).

**D.2.2.4.2 Medios**

MEM (tamponado con bicarbonato sódico) suplementado con (se especifican las concentraciones finales en MEM):

(A) Para congelación

- 20% FCS
- 7% a 10% DMSO

(B) Para cultivos sistemáticos

- 10% FCS
- 4 mM glutamina o glutamax
- 100 UI/mL penicilina
- 100 µg/mL estreptomycinina

Los medios completos se deberían mantener a 4 °C y se deberían almacenar durante no más de dos semanas.

#### D.2.2.4.3 Solución de XTT/PMS

El XTT se prepara recientemente disolviéndolo en MEM a temperatura comprendida entre 56 °C y 60 °C, sin rojo fenol, a una concentración de 1 mg/mL con la ayuda de un agitador. La solución se esteriliza por filtración estéril utilizando filtros de jeringa (tamaño de poro < 0,22  $\mu$ m). El PMS (metosulfato de fenacina) se prepara como una solución de 5 mM en tampón PBS y se somete a filtración estéril a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m.

La solución de PMS se añade a la solución de XTT inmediatamente antes de su utilización con una concentración de 25 M (5 mL de una solución de 5 mM PMS/mL XTT). La solución de XTT/PMS se añade entonces inmediatamente a los pocillos de ensayo.

#### D.2.2.4.4 Preparación del extracto de la muestra

Las muestras se extraen de acuerdo con la Norma ISO 10993-12, utilizando MEM sin rojo fenol y con FBS.

### D.2.3 Métodos

#### D.2.3.1 Generalidades

Para los métodos de cultivo celular sistemáticos, véase el anexo C de la referencia [1].

#### D.2.3.2 Verificación de la calidad del análisis (CA); control positivo (PC) y control negativo (NC)

Se deben incluir controles positivos y negativos en cada ensayo de citotoxicidad. Se recomienda la utilización de materiales de referencia para el control positivo y el control negativo, por ejemplo, ZDEC y ZDBC (véase la nota al pie 1 en la página 9).

#### D.2.3.3 Verificación de la calidad del análisis (CA); blanco

El valor absoluto de la densidad óptica ( $OD_{450}$ ) obtenido en el blanco sin tratar indica si las  $1 \times 10^4$  células sembradas por pocillo han crecido exponencialmente con un tiempo de doblaje normal durante los dos días del análisis.

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio de la  $OD_{450}$  del blanco es > 0,2.

Para verificar la existencia de errores sistemáticos durante el sembrado celular, los blancos se colocan tanto al lado izquierdo (fila 2) como al lado derecho (fila 11) de la placa de 96 pocillos (la fila 1 y la fila 12 no se deben utilizar; para la disposición de las placas, véase el anexo E en la referencia [1]).

Un ensayo cumple los criterios de aceptación si el valor medio izquierdo y derecho de los blancos no difiere en más del 15% del valor medio de todos los blancos.

Las verificaciones de los errores de sembrado celular se pueden efectuar también examinando cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que la cantidad de células es coherente. La evaluación microscópica hace innecesaria la utilización de dos filas de blancos.

#### D.2.3.4 Procedimiento de ensayo

**IMPORTANTE** - Después de la descongelación a partir de la solución de reserva, se efectúan dos o tres pases antes de utilizar las células en el ensayo.

La tabla D.1 muestra el flujo de trabajo del procedimiento de ensayo.

##### **1<sup>er</sup> día después del crecimiento de las células a partir de la solución de reserva**

- Los cultivos celulares se retiran de los matraces de cultivo por digestión enzimática (tripsina/EDTA) y la suspensión celular se centrifuga (200 g, 3 min). Las células se resuspenden entonces en medio de cultivo y la suspensión celular se ajusta a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL. Utilizando una pipeta multicanal, se dispensan 100 µl del medio de cultivo solamente (blancos) en los pozos periféricos de una placa de microtitulación y cultivo celular de 96 pocillos (= blancos, véase el apéndice E en la referencia [1]). En los pocillos restantes, se dispensan 100 µl de una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/mL (=  $1 \times 10^4$  células/pocillo).
- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%) de forma que las células formen una monocapa semiconfluyente. Este periodo de incubación asegura la recuperación de las células, y su adherencia y progresión a la fase de crecimiento exponencial.
- Se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para asegurar que el crecimiento celular es relativamente homogéneo en toda la placa de microtitulación. Esta verificación se efectúa para identificar errores experimentales.

##### **2<sup>o</sup> día**

- Después de la incubación durante 24 h, se aspira el medio de cultivo de las células.
- En cada pocillo, se añaden 100 µl de medio de tratamiento conteniendo ya sea la concentración apropiada del extracto de la muestra, o el control negativo, o el control positivo o nada excepto el blanco. Se deberían ensayar al menos cuatro concentraciones diferentes del extracto del artículo de ensayo o del extracto del control positivo. La concentración más alta utilizada debería ser el extracto 100% y las otras concentraciones quedarán espaciadas adecuadamente dentro de un único rango logarítmico. Para el control negativo, se debería ensayar solamente el extracto 100%. El medio de cultivo se debería utilizar como blanco.
- Se incuban las células durante 24 h (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%).



**3<sup>er</sup> día**

Después del tratamiento durante 24 h, se examina cada placa bajo un microscopio de contraste de fase para identificar los errores sistemáticos de siembra celular y las características del crecimiento de las células de control y de las células tratadas.

Se registran los cambios en la morfología celular debidos a los efectos citotóxicos del extracto de la muestra de ensayo, pero no se utilizan estos registros para ninguna medida cuantitativa de la citotoxicidad. Las características no deseables del crecimiento de las células de control pueden indicar un error experimental y pueden ser causa del rechazo del análisis.

Después del examen de las placas, se añaden entonces 50 µl de la solución de XTT/PMS a cada pocillo de ensayo y las placas se incuban de nuevo durante 3 h a 5 h en la incubadora a 37 °C. Las placas se deberían mantener en un entorno oscuro. Entonces las placas se oscilan suavemente y se transfiere una alícuota de 100 µl desde cada pocillo al pocillo correspondiente de una nueva placa y esta nueva placa se transfiere posteriormente a un lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm para leer la absorbancia (longitud de onda para la referencia 630 nm).

**Tabla D.1 — Flujo de trabajo del ensayo de citotoxicidad XTT**

Tiempo h	Procedimiento
00:00	Se siembran placas de 96 pocillos: $1 \times 10^4$ células/100 µl de medio de cultivo MEM/pocillo Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 22 h a 26 h)
24:00	Se retira el medio de cultivo
24:00	Se trata con > 4 concentraciones del extracto de la muestra de ensayo en medio de tratamiento (100 l) (blanco sin tratar = medio de tratamiento) Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 24 h)
48:00	Evaluación microscópica de las alteraciones morfológicas Se añaden 50 µl de la solución de XTT/PMS Se incuba a (37 °C / 5% CO <sub>2</sub> / 3 h a 5 h)
51:00	Se oscila suavemente la placa Se transfieren 100 µl desde cada pocillo a una nueva placa
51:30	Se detecta la absorción a 450 nm (la referencia a 630 nm)

#### D.2.4 Registro de los datos

Los datos generados se registrarán en el archivo de datos sin procesar. Los resultados se presentarán en forma tabular, incluyendo los grupos experimentales con el artículo de ensayo, controles negativos, blancos y positivos.

#### D.2.5 Análisis de datos

Un descenso en el número de células vivas da como resultado un descenso en la actividad global de las deshidrogenasas mitocondiales en la muestra. Este descenso se correlaciona directamente con la cantidad de formazán anaranjado formado, monitorizado por la densidad óptica a 450 nm. Para calcular la reducción de la viabilidad comparada con el blanco, se utiliza la ecuación (D.1):

(D.1)

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times OD_{450e}}{OD_{450b}}$$

Donde

$OD_{450e}$  es el valor medio de la densidad óptica medida de los extractos 100% de la muestra de ensayo;

$OD_{450b}$  es el valor medio de la densidad óptica medida de los blancos.

Cuanto más bajo es el valor de la Viab. %, tanto mayor es el potencial citotóxico del artículo de ensayo.

Si la viabilidad se reduce < 70% respecto al blanco, el artículo objeto del ensayo tiene potencial citotóxico. El extracto 50% de la muestra de ensayo debería tener al menos una viabilidad igual o superior que la del extracto 100%; de lo contrario el ensayo se debería repetir.

### Bibliografia

- [1] Guidance Document on Using *In Vitro* Data to Estimate *In Vivo* Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500 available under ([http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox\\_docs/guidance0801/iv\\_guide.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf)).
- [2] Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa, 36, 2003.
- [3] BORENFREUND, E. and PUERNER, J.A. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicological Letters*, 24, pp. 119-124, 1985.
- [4] United States Pharmacopeia.
- [5] COECKE, S., BALLS, M., BOWE, G., DAVIS, J., CSTRALTHALER, G., HARTUNG, T., HAY, R., MERTEN, O., PRICE, A., SCHECTMAN, L., STACEY, G. and STOKES, W. Guidance on Good Cell Culture Practice, *A Report of the Second CVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*, ATLA, 33, pp. 261-287, 2005.
- [6] ISAMA, K., MATSUOKA, A., HAISHIMA, Y. and TSUCHIYA, T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cell. *Mater. Trans.*, 43, pp. 3155-3159, 2002.
- [7] TSUCHIYA, T. Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomaterials Applications*, 5, pp. 139-157, 1994.
- [8] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods*, 65, pp. 55-63, 1983.
- [9] SCUDERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., MONKS, A, TERNEY, S., NOFZIGER, T.H., CURRENS, M.J., SENIFF, D. and BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48, pp. 4827-4833, 1988.
- [10] SPIELMANN, H, et al., *Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany*, *Toxicol. In Vitro*, 5, pp. 539-542, 1991.
- [11] HEXIG, B., NAKAOKA, R. and TSUCHIYA, T. Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity testing. *J. Artif. Organs*, 11, pp. 204-211, 2008