

"2021, Año de la Independencia"

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2021, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: - _____
Dirección: - _____
Correo electrónico: _____

MONOGRAFÍA NUEVA

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA-DM 10993-10 PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD. PRUEBAS DE IRRITACIÓN Y SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL (INFORMATIVO).		
Alcance.		
Este MGA-DM de la Serie de pruebas de Biocompatibilidad describe el procedimiento para la evaluación de dispositivos médicos y sus materiales constituyentes con respecto a su potencial para producir irritación y sensibilización de la piel.		
Este MGA-DM incluye:		
A. Consideraciones preliminares para la irritación, incluidos los métodos <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> para exposición dérmica;		
B. Detalles de los procedimientos de prueba <i>in vivo</i> (irritación y sensibilización);		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
C. Factores clave para la interpretación de los resultados.		
En el <i>Anexo A</i> se dan instrucciones para la preparación de materiales específicamente en relación con las pruebas anteriores. En el <i>Anexo B</i> , se describen varias pruebas especiales de irritación para la aplicación de dispositivos médicos en áreas distintas de la piel.		
Referencias normativas.		
Este MGA-DM está basado en la norma ISO 10993-10, <i>Evaluación biológica de equipos médicos - Parte 10: Pruebas de irritación y sensibilización de la piel</i> .		
La última edición de los siguientes documentos referenciados (incluyendo cualquier modificación), son indispensables para la aplicación de estas pruebas:		
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.		
Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, <i>Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos</i> .		
<i>MGA-DM 10993-1. Pruebas de biocompatibilidad. Evaluación y pruebas dentro de un proceso de gestión de riesgos (informativo).</i>		
<i>MGA-DM 10993-2. Pruebas de biocompatibilidad. Requerimientos de bienestar animal (informativo).</i>		
Norma ISO 10993-9, <i>Evaluación biológica de dispositivos médicos — Parte 9: Marco de</i>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<i>referencia para la identificación y cuantificación de productos de degradación potenciales.</i>		
<i>MGA-DM 10993-12. Pruebas de biocompatibilidad. Preparación de muestras y materiales de referencia (informativo)</i>		
<i>Norma ISO 10993-13, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 13: Identificación y cuantificación de productos de degradación de dispositivos médicos poliméricos.</i>		
<i>Norma ISO 10993-14, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 14: Identificación y cuantificación de productos de degradación de cerámicos.</i>		
<i>MGA-DM 10993-15. Pruebas de biocompatibilidad. Identificación y cuantificación de productos de degradación de metales y aleaciones (informativo).</i>		
<i>MGA-DM 10993-18. Pruebas de biocompatibilidad. Caracterización química de materiales (informativo).</i>		
<i>Norma ISO 14155-1, Investigación clínica de dispositivos médicos en seres humanos - Parte 1: Requisitos generales.</i>		
<i>Norma ISO 14155-2, Investigación clínica de dispositivos médicos en seres humanos - Parte 2: Planes de investigación clínica.</i>		
Términos y definiciones.		
<i>Para los propósitos de este MGA, las definiciones proporcionadas en el MGA-DM 10993-1, y las siguientes, aplican:</i>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Control negativo , a cualquier material o sustancia bien caracterizada que, cuando se prueba mediante un procedimiento específico, demuestra la idoneidad del procedimiento para producir una respuesta reproducible, apropiadamente negativa, no reactiva o mínima en el sistema de prueba.		
Nota: en la práctica, los controles negativos incluyen blancos, vehículos o solventes y materiales de referencia.		
Control positivo , a cualquier material o sustancia bien caracterizada que, cuando se evalúa mediante un método de prueba específico, demuestra la idoneidad del sistema de prueba para producir una respuesta reproducible, apropiadamente positiva o reactiva en el sistema de prueba.		
Corrosión cutánea , producción de daño irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y hacia la dermis, luego de la aplicación de una muestra de prueba. Ejemplo: la acción de un compuesto, producto químico o muestra de prueba que resulta en ulceración de la piel (véase la definición de ulceración).		
Dosis , a la cantidad de muestra de prueba administrada (por ejemplo, masa, volumen) expresada por unidad de peso corporal o área de superficie.		
Nota: los términos a menudo se usan indistintamente (más comúnmente dosificación).		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Edema , a la hinchazón debido a la infiltración anormal de líquido en los tejidos.		
Elicitación del desafío , al proceso que sigue a la fase de inducción, en la cual se examinan los efectos inmunológicos de exposiciones posteriores en un individuo al material inductor.		
Blanco , al vehículo de extracción que no contiene el material de prueba, retenido en un recipiente idéntico al que contiene el material de prueba y sometido a condiciones idénticas a las que se somete el material de prueba durante su extracción.		
Nota: el propósito del control en blanco es evaluar los posibles efectos de confusión debido al recipiente de extracción, el vehículo y el proceso de extracción.		
Eritema , al enrojecimiento de la piel o membrana mucosa.		
Escara , a la costra o piel descolorida.		
Extracto , al líquido o suspensión que resulta de exponer un material de prueba o control a un solvente bajo condiciones controladas.		
Inducción , al proceso que conduce a la generación de novo de un estado mejorado de actividad inmunológica en un individuo, a un material específico.		
Irritación , a la respuesta inflamatoria no específica localizada a la aplicación única, repetida o continua de una sustancia / material.		



"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Nota: la irritación de la piel es una reacción reversible y se caracteriza principalmente por eritema local (enrojecimiento) de la piel.		
Irritante , al agente que produce irritación.		
Material de prueba , al material, dispositivo, porción del dispositivo o componente del mismo que se muestrea para pruebas biológicas o químicas.		
Necrosis , a la muerte celular como resultado directo de cambios irreversibles causados por lesiones o enfermedades.		
Nota: se debe tener en cuenta que la reparación del tejido se producirá ya sea como resultado de una restauración funcional completa o como resultado de la formación de cicatrices.		
Sensibilizador alergénico , a la sustancia o material que es capaz de inducir una reacción de hipersensibilidad específica al contacto repetido con esa sustancia o material.		
Sensibilización cutánea , a la dermatitis alérgica de contacto reacción cutánea mediada inmunológicamente a una sustancia.		
Nota: en el ser humano, las respuestas pueden caracterizarse por prurito, eritema, edema, pápulas, vesículas, ampollas o una combinación de estas. En otras especies, las reacciones pueden diferir y solo pueden observarse eritema y edema.		
Ulceración , a la llaga abierta que representa la pérdida de tejido superficial		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Vehículo , al líquido utilizado para humedecer, diluir, suspender, extraer o disolver la sustancia / material de prueba.		
PRINCIPIOS GENERALES: ENFOQUE GRADUAL		
Los métodos disponibles para evaluar la irritación y la sensibilización se desarrollaron específicamente para detectar la irritación de la piel y las membranas mucosas, así como el potencial de sensibilización de la piel. Por lo general, estas pruebas no predicen otros tipos de incidentes adversos. Para los dispositivos médicos que se usan como implantes o dispositivos de comunicación externos, las pruebas intradérmicas son más relevantes para abordar la aplicación y, por lo tanto, para la detección de la actividad de irritación, las pruebas intracutáneas se deben usar como se describe en el <i>punto 6.4</i> .		
Este MGA-DM requiere un enfoque gradual, que debe incluir una o más de las siguientes consideraciones:		
A. Caracterización del material de prueba, que implica la caracterización química y el análisis de la muestra de prueba de acuerdo con los principios generales descritos en las normas ISO 10993-9, ISO 10993-13 e ISO 10993-14, así como en el <i>MGA-DM 10993-15</i> y el <i>MGA-DM 10993-18</i> .		
B. Revisión de la literatura, incluida una evaluación de las propiedades químicas y físicas, e información sobre la irritación y el potencial de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
sensibilización de cualquier componente del producto, así como de productos químicos y materiales relacionados estructuralmente.		
C. De acuerdo con el MGA-DM 10993-2, se considerarán las pruebas <i>in vitro</i> en lugar de las pruebas <i>in vivo</i> , y el reemplazo de este último a medida que las nuevas pruebas <i>in vitro</i> estén validadas científicamente y estén disponibles de manera razonable y práctica. Para la evaluación de la irritación y corrosión de la piel, hay alternativas <i>in vitro</i> disponibles para productos químicos; actualmente no hay pruebas <i>in vitro</i> validadas y aceptadas internacionalmente para detectar sensibilizadores.		
D. Pruebas en animales <i>in vivo</i> : para garantizar la reproducibilidad y la sensibilidad, el laboratorio de pruebas incluirá una prueba de una sustancia de control positivo para irritación y sensibilización de la piel en cada ensayo para validar el sistema de prueba y demostrar una respuesta positiva; sin embargo, para los ensayos de sensibilización en cobayos, cuando se ha demostrado la consistencia durante un período prolongado de seis meses o más, no es necesario incluir un control positivo en cada ensayo, pero se puede ejecutar a intervalos regulares que no excederán los seis meses.		
Nota 1: por el momento, la sensibilización sólo puede determinarse mediante un ensayo <i>in vivo</i> . Esto se puede lograr utilizando el ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA, por sus siglas en		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
inglés) en ratones, la prueba de parche ocluido en cobayos o la prueba de maximización en cobayo (GPMT, por sus siglas en inglés). Para productos químicos individuales, el LLNA es ahora el ensayo preferido para determinar el potencial sensibilizante. Véanse las referencias [69] [88] [90].		
Nota 2: las pruebas con animales <i>in vivo</i> son apropiadas cuando los materiales de prueba no pueden caracterizarse y las evaluaciones de riesgos no pueden llevarse a cabo utilizando la información obtenida por los medios establecidos en A, B y C.		
Nota 3: para los ensayos de sensibilización en cobayo, normalmente se utilizan diez animales para el control positivo una vez cada seis meses. Se pueden usar menos cobayos cuando se realiza un ensayo con una sustancia de control positivo con más frecuencia que una vez cada seis meses. Se deben utilizar al menos cinco animales de prueba con una sustancia positiva y cinco animales de control.		
E. Pruebas no invasivas en humanos o ensayos clínicos. Si se ha demostrado que el material no es irritante, sensibilizador o tóxico en animales, los estudios sobre irritación de la piel se pueden considerar en humanos.		
De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, con las normas ISO 14155-1, ISO 14155-2 y los principios de ética no se realizarán los		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
estudios clínicos antes de que se conozcan los resultados de las otras evaluaciones en A, B, C y D.		
5. CONSIDERACIONES PREVIAS A LA PRUEBA		
5.1 General		
Es importante enfatizar que las consideraciones previas a la prueba pueden llevar a la conclusión de que las pruebas de irritación y/o sensibilización no son necesarias.		
Aplicar los requisitos establecidos en el <i>punto 5</i> del MGA-DM 10993-1.		
Las muestras no estériles se investigarán solo mediante investigación tópica, ya que la posibilidad de contaminación microbiana de la muestra de prueba podría confundir la interpretación final del ensayo. En los casos en que no se puede garantizar la esterilidad de una muestra de prueba, pero la muestra aún se considera no contaminada, la administración intradérmica puede estar justificada.		
5.2 Tipos de material		
5.2.1 Consideraciones iniciales		
Se debe tener en cuenta que, durante la fabricación y ensamble de dispositivos médicos, se pueden usar componentes químicos adicionales como auxiliares de procesamiento, por ejemplo, lubricantes o agentes de desmoldeo. Además de los componentes químicos del material de partida y los auxiliares del proceso de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
fabricación, los residuos de adhesivo o disolvente del ensamblaje y también los residuos esterilizantes o productos de reacción resultantes del proceso de esterilización que pueden estar presentes en un producto terminado. Si estos componentes representan un peligro o riesgo para la salud depende de las características de fuga o degradación de los productos terminados. Estos componentes deben tenerse en cuenta por su potencial irritación o actividad de sensibilización.		
5.2.2 Cerámica, metales y aleaciones.		
Estos materiales son normalmente menos complejos que los polímeros y los materiales derivados biológicamente en términos del número de constituyentes químicos.		
5.2.3 Polímeros		
Estos materiales son normalmente químicamente más complejos que los del <i>punto</i> 5.2.2 en términos de composición. Pueden estar presentes varios productos de reacción, impurezas, aditivos y la integridad de la polimerización puede variar.		
5.2.4 Materiales derivados biológicamente		
Estos materiales son intrínsecamente complejos en su composición. A menudo también contienen residuos del proceso, por ejemplo, reticuladores y agentes antimicrobianos. Los materiales biológicos pueden ser inconsistentes de muestra a muestra.		
Este MGA-DM no ha sido diseñado para probar materiales derivados biológicamente. Por ejemplo,		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
las pruebas contenidas en este MGA-DM no consideran la sensibilización entre especies.		
5.3 Información sobre composición química		
5.3.1 General		
Se deben establecer datos cualitativos completos sobre los componentes químicos del material. Cuando sea relevante para la seguridad biológica, también se obtendrán datos cuantitativos. Si no se obtienen datos cuantitativos, la justificación deberá documentarse y justificarse.		
5.3.2 Fuentes de datos existentes		
La información cualitativa y cuantitativa sobre la composición se obtendrá siempre que sea posible del proveedor del material de partida.		
Para los polímeros, esto a menudo requiere acceso a información patentada. Se debe prever la transferencia y el uso de dicha información confidencial.		
La información cualitativa sobre cualquier aditivo de procesamiento adicional (por ejemplo, agentes desmoldantes) también se debe obtener de los miembros apropiados de la cadena de fabricación, incluidos los fabricantes de componentes y convertidores.		
En ausencia de datos sobre la composición, se recomienda un estudio de la literatura para establecer la naturaleza probable del material de partida y cualquier aditivo, a fin de ayudar en la selección de los métodos de análisis más apropiados para el material en cuestión.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
La composición química de los productos terminados se determinará de acuerdo con el MGA-DM 10993-18.		
Nota: la composición de cerámica, metales y aleaciones puede especificarse de acuerdo con las normas ISO o los estándares ASTM y/o puede ser especificada por el usuario. Sin embargo, para obtener todos los detalles cualitativos y cuantitativos sobre la composición, puede ser necesario solicitarlos al proveedor o fabricante del material de partida y también a los fabricantes de componentes para garantizar que también se identifiquen los auxiliares de procesamiento. Los archivos maestros de materiales en poder de las autoridades reguladoras son otra fuente de datos, donde son accesibles.		
6. PRUEBAS DE IRRITACIÓN		
6.1 Pruebas de irritación <i>in vitro</i>		
Los métodos <i>in vitro</i> , la prueba de resistencia eléctrica transcutánea (RET) de piel de rata y la prueba del modelo de piel humana, han sido validadas internacionalmente y aceptadas como pruebas alternativas para evaluar la corrosividad de los productos químicos en la piel (Directrices 430 y 431 de la OCDE, véanse las referencias [9] y [10]). Las organizaciones nacionales e internacionales continúan trabajando para desarrollar y validar pruebas <i>in vitro</i> de irritación de la piel en paralelo con la búsqueda de métodos alternativos; otros han estado desarrollando métodos para cuantificar las respuestas de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
animales y humanos con el fin de definir mejor los puntos finales utilizando técnicas no invasivas (véase el <i>punto F.1</i>).		
Nota: El uso de modelos de piel humana <i>in vitro</i> para evaluar el potencial de los químicos para inducir irritación de la piel se describe en el <i>Anexo D</i> . Véase la referencia [101].		
La prueba <i>in vitro</i> de irritación de la piel hasta ahora se ha validado solo para productos químicos puros y no para extractos de dispositivos médicos. Con el fin de aplicar estos ensayos para probar el potencial de irritación de los dispositivos médicos, es esencial una validación adicional para esta área específica.		
6.2 Pruebas de irritación <i>in vivo</i>: factores a considerar en el diseño y selección de pruebas <i>in vivo</i>.		
Las pruebas de irritación de dispositivos médicos se pueden realizar con el producto terminado y/o extractos de los mismos.		
Los factores que afectan los resultados de los estudios de irritación incluyen los siguientes:		
A. La naturaleza del dispositivo utilizado en una prueba de parche.		
B. La dosis del material de prueba.		
C. El método de aplicación del material de prueba.		
D. El grado de oclusión.		
E. El sitio de la aplicación.		
F. La duración y el número de exposiciones.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
G. Las técnicas utilizadas en la evaluación de la prueba.		
Se proporciona información adicional sobre antecedentes en el <i>Anexo F</i> .		
Si bien la flexibilidad con respecto al protocolo exacto seguido permite al investigador mejorar la sensibilidad de la prueba para adaptarse a las condiciones de uso y exposición de la población, la consistencia en el procedimiento contribuye a la comparabilidad de los resultados de la prueba con diferentes materiales y de diferentes laboratorios.		
Se han incluido disposiciones en los procedimientos de prueba para la evaluación de dispositivos y materiales que tendrán exposición repetida y/o prolongada. El estudio estará diseñado para exagerar el contacto anticipado (tiempo y/o concentración) en la situación clínica. Esto se tendrá en cuenta durante la interpretación del resultado.		
Se debe considerar al material como un irritante si el pH de la muestra de prueba es ≤ 2.0 o ≥ 11.5 , por lo que no se requieren más pruebas. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que la acidez y la alcalinidad del material de prueba no son los únicos factores a considerar en relación con la capacidad de un material para producir lesiones graves. La concentración del material de prueba, su período de contacto y muchas otras propiedades físicas y químicas también son importantes		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
En casos excepcionales donde se necesita una mayor caracterización o evaluación del riesgo, podría ser necesario probar materiales que sean irritantes o que tengan un pH fuera del rango mencionado anteriormente. Estos casos deberán estar justificados y documentados.		
6.3 Prueba de irritación animal		
6.3.1 Principio		
Realizar una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación dérmica en un modelo animal relevante.		
El conejo es el animal de prueba preferido.		
6.3.2 Material de prueba		
Si el material de prueba es sólido o líquido, preparar como se especifica en el <i>Anexo A</i> .		
Demostrar la sensibilidad del ensayo. Esto se puede hacer mediante la inclusión de un control positivo en el ensayo. Sin embargo, el uso de un control positivo para confirmar la sensibilidad solo se justifica cuando el laboratorio de pruebas no ha producido resultados positivos en los seis meses anteriores utilizando el método de prueba.		
Nota: un control positivo adecuado es el lauril sulfato de sodio.		
6.3.3 Animales y crías		
Se utilizarán 3 conejos albinos adultos jóvenes sanos de una sola cepa que pesen no menos de 2 kg. Si la irritación se anticipa, se considerará la posibilidad de realizar primero pruebas en un animal. A menos que se observe una respuesta		

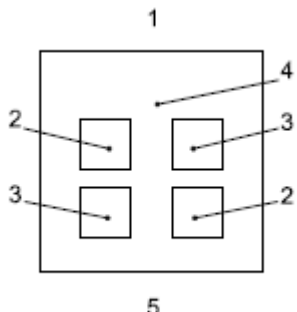
"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*																												
positiva bien definida (puntuación superior a 2 para eritema o edema (ver tabla 1), se utilizará un mínimo de 2 animales adicionales. Si la respuesta en la prueba usando el mínimo de tres animales es equivoca, se considerarán pruebas adicionales.																														
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el MGA-DM 10993-2																														
<i>Tabla 1. Sistema de puntuación para la reacción cutánea.</i> <table><tr><th>Reacción</th><th>Nivel de irritación</th></tr><tr><td>Eritema y formación de escaras</td><td></td></tr><tr><td>Sin rastro de eritema</td><td>0</td></tr><tr><td>Eritema muy leve (apenas perceptible)</td><td>1</td></tr><tr><td>Eritema bien definido</td><td>2</td></tr><tr><td>Eritema moderado</td><td>3</td></tr><tr><td>Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema</td><td>4</td></tr><tr><td>Formación de edema</td><td></td></tr><tr><td>Sin edema</td><td>0</td></tr><tr><td>Edema muy leve (apenas perceptible)</td><td>1</td></tr><tr><td>Edema bien definido (bordes del área bien definidos por elevación definida)</td><td>2</td></tr><tr><td>Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm)</td><td>3</td></tr><tr><td>Edema severo (elevado más de 1 mm y que se extiende más allá del área de exposición)</td><td>4</td></tr><tr><td>Puntuación máxima posible para irritación</td><td>8</td></tr></table> Registrar e informar otros cambios adversos en los sitios de la piel.	Reacción	Nivel de irritación	Eritema y formación de escaras		Sin rastro de eritema	0	Eritema muy leve (apenas perceptible)	1	Eritema bien definido	2	Eritema moderado	3	Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema	4	Formación de edema		Sin edema	0	Edema muy leve (apenas perceptible)	1	Edema bien definido (bordes del área bien definidos por elevación definida)	2	Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm)	3	Edema severo (elevado más de 1 mm y que se extiende más allá del área de exposición)	4	Puntuación máxima posible para irritación	8		
Reacción	Nivel de irritación																													
Eritema y formación de escaras																														
Sin rastro de eritema	0																													
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1																													
Eritema bien definido	2																													
Eritema moderado	3																													
Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema	4																													
Formación de edema																														
Sin edema	0																													
Edema muy leve (apenas perceptible)	1																													
Edema bien definido (bordes del área bien definidos por elevación definida)	2																													
Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm)	3																													
Edema severo (elevado más de 1 mm y que se extiende más allá del área de exposición)	4																													
Puntuación máxima posible para irritación	8																													

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
6.3.4 Procedimiento de prueba		
6.3.4.1 Preparación de animales		
La condición de la piel es un factor crítico. Usar solo animales con piel sana e intacta. El pelaje generalmente se recorta dentro de las 24 a 4 h de prueba en la espalda de los animales, a una distancia suficiente a ambos lados de la columna vertebral para la aplicación y observación de todos los sitios de prueba (aproximadamente 10 cm × 15 cm). La piel se puede volver a recortar para facilitar la observación y/o acomodar exposiciones repetidas. Los depilatorios pueden ser utilizados por técnicos capacitados, si el proceso ha sido validado en la instalación de prueba. Si se requiere exposición repetida, deberá seguir los procedimientos de los puntos 6.3.4.2.1, 6.3.4.2.2 o 6.3.4.2.3, repetidos por un máximo de 21 días.		
6.3.4.2 Aplicación de muestra de prueba		
6.3.4.2.1 Aplicación de polvo o muestra líquida		
Aplicar 0.5 g o 0.5 mL del material de prueba directamente a cada sitio de la piel de prueba como se muestra en la <i>figura 1</i> . Para materiales sólidos e hidrófobos, no hay necesidad de humedecer. Si el material es un polvo, humedecer ligeramente con agua u otro vehículo adecuado antes de la aplicación (véase el <i>Anexo A</i>).		
Cubrir los sitios de aplicación con un apósito no oclusivo de 2.5 cm × 2.5 cm (como un parche de gasa absorbente) y envolver el sitio de aplicación con un vendaje (semi-oclusivo u oclusivo) durante		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
un mínimo de 4 h. Al final del tiempo de contacto, retirar los apósitos y marcar las posiciones de los sitios con tinta permanente. Eliminar el material de prueba residual por medios apropiados, tales como lavado con agua tibia u otro solvente no irritante adecuado, y secado cuidadoso.		
		
Donde:		
1 = extremo craneal.		
2 = sitio de prueba.		
3 = sitio de control.		
4 = región dorsal recortada.		
5 = extremo caudal.		
<i>Figura 1. Ubicación de los sitios de aplicación de piel.</i>		
6.3.4.2.2 Aplicación de extractos y vehículo de extracción		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Aplicar los extractos apropiados a los parches de gasa absorbente de 2.5 cm × 2.5 cm. Use un volumen de extracto suficiente para saturar la gasa, generalmente 0.5 mL por parche. Aplicar un parche a cada lado del animal como se muestra en la <i>figura 1</i> . Aplique un parche de gasa de control humedecido con el vehículo de extracción como se muestra en la <i>figura 1</i> .		
Cubrir los sitios de aplicación con un vendaje (semi-oclusivo u oclusivo) durante un mínimo de 4 h. Al final del tiempo de contacto, retire los apósitos y marque las posiciones de los sitios con tinta permanente. Retirar el material de prueba residual por los medios apropiados, como lavar con agua tibia u otro solvente no irritante adecuado y secado cuidadoso.		
6.3.4.2.3 Aplicación de muestra sólida		
Aplicar las muestras del material de prueba directamente a la piel a cada lado de cada conejo como se muestra en la <i>figura 1</i> .		
Del mismo modo, aplique las muestras de control a cada conejo. Cuando se prueban sólidos (que pueden pulverizarse si se considera necesario), el material de prueba debe humedecerse lo suficiente con agua o, cuando sea necesario, un solvente alternativo, para asegurar un buen contacto con la piel (véase el <i>Anexo A</i>). Cuando se usan solventes, se debe tener en cuenta la influencia del solvente sobre la irritación de la piel causada por el material de prueba.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Cubra los sitios de aplicación con apósitos no oclusivos de 2.5 cm × 2.5 cm (como un parche de gasa) y luego envuelva los sitios de aplicación con un vendaje (semi-oclusivo u oclusivo) durante un mínimo de 4 h. Al final del tiempo de contacto, retire los apósitos y marque las posiciones de los sitios con tinta permanente. Retire el material de prueba residual por los medios apropiados, como lavar con agua tibia u otro solvente no irritante adecuado y secar cuidadosamente.		
6.3.5 Observación de animales.		
6.3.5.1 General		
Se recomienda el uso de iluminación natural o de espectro completo para visualizar las reacciones de la piel. Describa y califique las reacciones cutáneas para el eritema y el edema de acuerdo con el sistema de puntuación proporcionado en la <i>tabla 1</i> , para cada sitio de aplicación en cada intervalo de tiempo, y registre los resultados para el informe de la prueba.		
Nota: Las técnicas histológicas o no invasivas para evaluar las reacciones cutáneas pueden ayudar en ciertos casos.		
6.3.5.2 Prueba de exposición única		
Para las pruebas de exposición única, registre la apariencia de cada sitio de aplicación a 1 ± 0.1 h, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la eliminación de los parches. La observación extendida puede ser necesaria si hay lesiones		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
persistentes, para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de las lesiones durante un período de tiempo que no exceda los 14 días.		
6.3.5.3 Prueba de exposición repetida		
La exposición repetida solo se llevará a cabo después de completar una prueba de exposición única aguda (después de al menos 72 ± 2 h de observación).		
Para las pruebas de exposición repetida, registre las apariencias del sitio de aplicación a 1 ± 0.1 h después de retirar los parches e inmediatamente antes de la siguiente aplicación. El número de exposiciones puede variar.		
Después de la última exposición, observe la apariencia de cada sitio de aplicación a 1 ± 0.1 h, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la eliminación de los parches. La observación extendida puede ser necesaria si hay lesiones persistentes, para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de las lesiones. Esto no necesita exceder un período de 14 d.		
6.3.6 Evaluación de resultados		
Para pruebas de exposición única, determine el índice de irritación primaria (<i>PII</i> , por sus siglas en inglés) de la siguiente manera.		
Utilice únicamente observaciones 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h para los cálculos. Las observaciones realizadas antes de la dosificación o después de 72 h para controlar la recuperación no se utilizan en la determinación.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Después de la clasificación de 72 h, todos los grados de eritema más los grados de edema 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h se suman por separado para cada muestra de prueba y en blanco para cada animal. La puntuación de irritación primaria para un animal se calcula dividiendo la suma de todas las puntuaciones por 6 (dos sitios de prueba / observación, tres puntos de tiempo)		
Para obtener el índice de irritación primaria para la muestra de prueba, agregue todos los puntajes de irritación primaria de los animales individuales y divídalos por el número de animales (generalmente tres).		
Cuando se utiliza un control en blanco o negativo, calcule la puntuación de irritación primaria para los controles y reste esa puntuación de la puntuación utilizando el material de prueba para obtener la puntuación de irritación primaria.		
Para ensayos de exposición repetida, la puntuación de irritación primaria para cada animal se calculará de acuerdo con el principio mencionado anteriormente, teniendo en cuenta todos los puntos de evaluación. Para exposiciones repetidas, determine el índice de irritación acumulativa de la siguiente manera.		
Sume los puntajes de irritación de todos los animales y divídalos por el número total de animales. Este valor es el índice de irritación acumulativo.		
El índice de irritación acumulativa se compara con las categorías de respuesta a la irritación que		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*										
figuran en la <i>tabla 2</i> y se registra la categoría de respuesta apropiada para el informe.												
Nota: las categorías del índice de irritación acumulativa se basan en los datos que relacionan el índice de irritación primaria para químicos en conejos con la respuesta de irritación primaria en humanos para una cantidad de químicos que han sido probados en ambas especies.												
Para cualquier respuesta, registre la puntuación máxima de irritación primaria dada en la <i>tabla 1</i> para cada animal, el tiempo de inicio de la respuesta y el tiempo de respuesta máxima.												
El índice de irritación primario o acumulativo se caracteriza por el número (puntaje) y la descripción (categoría de respuesta) que figuran en la <i>tabla 2</i> . En caso de que se hayan analizado diferentes extractos, el que proporciona la PII más alta determina la categoría de respuesta.												
<i>Tabla 2. Categorías de índice de irritación primaria o acumulativa en un conejo.</i>												
<table><tr><td>Puntuación promedio</td><td>Categoría de respuesta</td></tr><tr><td>0 a 0.4</td><td>Despreciable</td></tr><tr><td>0.5 a 1.9</td><td>Leve</td></tr><tr><td>2 a 4.9</td><td>Moderada</td></tr><tr><td>5 a 8</td><td>Severa</td></tr></table>	Puntuación promedio	Categoría de respuesta	0 a 0.4	Despreciable	0.5 a 1.9	Leve	2 a 4.9	Moderada	5 a 8	Severa		
Puntuación promedio	Categoría de respuesta											
0 a 0.4	Despreciable											
0.5 a 1.9	Leve											
2 a 4.9	Moderada											
5 a 8	Severa											
6.3.7 Informe de prueba												
El informe de prueba incluirá:												
A. Una descripción de los materiales o dispositivos de prueba.												

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
B. La indicación de uso prevista de los materiales o dispositivos de prueba.		
C. Una descripción detallada del método empleado para preparar la muestra de prueba o el material de prueba.		
D. Una descripción de los animales de prueba.		
E. El método de aplicación a los sitios de prueba y el tipo (semi-oclusivo u oclusivo) de material de vendaje.		
F. Cómo se marcaron los sitios y las lecturas realizadas.		
G. Registros de las observaciones.		
H. Número de exposiciones e intervalos entre ellas, cuando se llevaron a cabo exposiciones repetidas.		
I. Evaluación de los resultados.		
6.4 Prueba de reactividad intracutánea (intradérmica) en animales		
6.4.1 Introducción		
Para los dispositivos médicos que se usan como implantes, está indicado el uso de una prueba de reactividad intracutánea (intradérmica). Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación después de la inyección intradérmica de extractos del material.		
6.4.2 Exclusión de la prueba		
Cualquier material que sea irritante para la piel, los ojos o las mucosas o un material con un $\text{pH} \leq 2.0$ o ≥ 11.5 no se analizará por vía intradérmica. En casos excepcionales donde se necesita una mayor		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
caracterización / evaluación del riesgo, podría ser necesario probar materiales que sean irritantes o que tengan un pH fuera del rango mencionado anteriormente. Estos casos deberán estar justificados y documentados.		
6.4.3 Muestra de prueba		
La muestra de prueba será un extracto preparado de acuerdo con el <i>Anexo A</i> . Como hay múltiples sitios de prueba en cada animal, se pueden aplicar varias muestras de prueba junto con los controles negativos apropiados o en blanco.		
6.4.4 Animales y cría		
Se utilizarán conejos albinos adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa, que pesen no menos de 2 kg.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el <i>MGA-DM 10993-2</i> . Inicialmente se utilizará un mínimo de tres animales para evaluar el material de ensayo. Si se anticipa irritación, se debe considerar primero la prueba en un animal. A menos que se observe una respuesta positiva bien definida [puntaje mayor a 2 para eritema o edema (véase la <i>tabla 1</i>)], se utilizará un mínimo de dos animales adicionales. Si la respuesta en la prueba con el mínimo de tres animales es equívoca, se considerarán más pruebas.		
6.4.5 Procedimiento de prueba		
Dentro de un período de 4 a 18 h antes de la prueba, sujete de cerca el pelaje en la espalda de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
los animales, permitiendo una distancia suficiente a ambos lados de la columna para la inyección de los extractos.		
Inyectar intracutáneamente 0.2 mL del extracto obtenido con solvente polar o no polar en cinco sitios en un lado de cada conejo. Usar la aguja más pequeña apropiada para la viscosidad del material de prueba para las inyecciones intradérmicas.		
Un ejemplo de la disposición de los sitios de inyección se presenta en la <i>figura 2</i> .		
Del mismo modo, inyectar 0.2 mL del control de solvente polar o no polar en cinco sitios del lado contralateral de cada conejo (por ejemplo, véase la <i>figura 2</i>).		
Si se usan otros solventes, repita los pasos anteriores para el extracto obtenido con los otros solventes y los controles de solvente.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
1 6		
Donde:		
1 = extremo craneal		
2 = inyecciones de 0.2 mL de extracto polar		
3 = inyecciones de 0.2 mL de extracto no polar		
4 = inyecciones de 0.2 mL de control de solvente polar		
5 = inyecciones de 0.2 mL de control de solvente no polar		
6 = extremo caudal		
<i>Figura 2. Disposición de los sitios de inyección.</i>		
6.4.6 Observación de animales.		
Observe la apariencia de cada sitio de inyección inmediatamente después de la inyección y a las 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la inyección.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*																				
Califique la reacción del tejido para eritema y edema de acuerdo con el sistema proporcionado en la <i>tabla 3</i> para cada sitio de inyección y en cada intervalo de tiempo observado, y registre los resultados.																						
Nota: La inyección intradérmica de aceite frecuentemente provoca una respuesta inflamatoria.																						
La inyección intravenosa de un tinte vital apropiado, como el azul Trypan o el azul Evans, puede realizarse en la lectura 72 ± 2 h para ayudar a evaluar la respuesta delineando el área de irritación.																						
Las técnicas no invasivas podrían usarse para ayudar en la evaluación si están disponibles.																						
Tabla 3. Sistema de clasificación para reacciones intracutáneas (intradérmicas)																						
<table><tr><th>Reacción</th><th>Nivel de irritación</th></tr><tr><td colspan="2">Eritema y formación de escaras</td></tr><tr><td>Sin eritema</td><td>0</td></tr><tr><td>Eritema muy leve (apenas perceptible)</td><td>1</td></tr><tr><td>Eritema bien definido</td><td>2</td></tr><tr><td>Eritema moderado</td><td>3</td></tr><tr><td>Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema</td><td>4</td></tr><tr><td colspan="2">Formación de edema</td></tr><tr><td>Sin edema</td><td>0</td></tr><tr><td>Edema muy leve (apenas perceptible)</td><td>1</td></tr></table>	Reacción	Nivel de irritación	Eritema y formación de escaras		Sin eritema	0	Eritema muy leve (apenas perceptible)	1	Eritema bien definido	2	Eritema moderado	3	Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema	4	Formación de edema		Sin edema	0	Edema muy leve (apenas perceptible)	1		
Reacción	Nivel de irritación																					
Eritema y formación de escaras																						
Sin eritema	0																					
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1																					
Eritema bien definido	2																					
Eritema moderado	3																					
Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a la formación de escamas, evitando la clasificación del eritema	4																					
Formación de edema																						
Sin edema	0																					
Edema muy leve (apenas perceptible)	1																					

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Edema bien definido (bordes del área bien definidos por elevación definida) 2 Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm) 3 Edema severo (elevado más de 1 mm y que se extiende más allá del área de exposición) 4 Puntuación máxima posible para irritación 8 Registrar e informar otros cambios adversos en los sitios de la piel.		
6.4.7 Evaluación de resultados		
Después de la clasificación 72 ± 2 h, todos los grados de eritema más los grados de edema 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h se suman por separado para cada muestra de prueba o en blanco para cada animal individual. Para calcular la puntuación de una muestra de prueba o blanco en cada animal individual, divida cada uno de los totales por 15 (3 puntos de tiempo de puntuación $\times$ 5 pruebas o sitios de inyección de muestra en blanco). Para determinar el puntaje promedio general para cada muestra de prueba y cada blanco correspondiente, sume los puntajes para los tres animales y divídalos entre tres. El puntaje final de la muestra de prueba se puede obtener restando el puntaje del blanco del puntaje de la muestra de prueba. Los requisitos de la prueba se cumplen si el puntaje final de la muestra de prueba es 1.0 o menos. Si en cualquier período de observación la reacción promedio a la muestra de prueba es cuestionablemente mayor que la reacción promedio al blanco, repita la prueba		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
usando tres conejos adicionales. Los requisitos de la prueba se cumplen si el puntaje final de la muestra de la prueba es 1.0 o menos.		
Nota: la muestra de control en blanco es el control de solvente polar o no polar como se menciona en la figura 2.		
6.4.8 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de los materiales o dispositivos de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de los materiales o dispositivos de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de inyección;		
f) cómo se realizaron las lecturas del sitio;		
g) un registro de las observaciones;		
h) una evaluación de los resultados.		
6.5 Prueba de irritación de la piel humana		
6.5.1 Introducción		
En la actualidad, la predicción de la irritación cutánea humana con fines de identificación de peligros se basa principalmente en el uso de animales de experimentación (véase el Anexo F). Sin embargo, hay problemas en la extrapolación de animales a humanos. Para los productos químicos a los que la exposición humana es alta (por ejemplo, cosméticos y detergentes), las		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
evaluaciones de riesgos se realizan mediante pruebas de parche de piel humana.		
Los estudios en humanos pueden servir para varios propósitos:		
A. Identificación directa del peligro humano probando productos químicos en humanos en lugar de en animales de laboratorio;		
B. Provisión de evaluación de riesgos de ciertos químicos a los cuales la exposición humana es alta;		
C. Facilitación de extrapolación a humanos de datos obtenidos previamente de estudios en animales de laboratorio.		
Este MGA-DM permite que los datos de irritación de la piel se obtengan directamente de humanos para propósitos de identificación de peligros. Su objetivo es determinar si un material presenta un riesgo significativo de irritación de la piel después de una exposición aguda.		
Las pruebas clínicas se realizarán de acuerdo con las Normas ISO 14155-1 e ISO 14155-2. Los requisitos específicos adicionales para las pruebas clínicas se describen en el Anexo C.		
Nota: el punto F.1 proporciona más información sobre las pruebas de irritación.		
6.5.2 Consideraciones iniciales		
La información adecuada sobre el perfil de toxicidad del material y (cuando corresponda) de sus componentes químicos, incluidos los datos de absorción percutánea, estará disponible para		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
indicar que el estudio no presenta ningún riesgo significativo para la salud.		
Los materiales no deben ser probados en humanos si:		
A. Se ha demostrado que son irritantes en un ensayo predictivo, <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> ;		
Nota: En ciertas situaciones, puede ser necesario realizar pruebas adicionales de muestras irritantes / extractos de productos en humanos para caracterizar aún más el riesgo humano potencial.		
B. Se ha demostrado que son corrosivos en un ensayo predictivo, <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> ;		
C. La corrosividad potencial para la piel humana puede predecirse sobre la base de las relaciones estructura / actividad y / o propiedades fisicoquímicas tales como una fuerte reserva ácida o alcalina;		
D. Presentan un riesgo de sensibilización de la piel o del tracto respiratorio;		
E. Presentan cualquier peligro de toxicidad aguda en condiciones de prueba;		
F. Presentan cualquier peligro genotóxico, reproductivo o cancerígeno.		
Se pueden encontrar más requisitos y orientación sobre la selección de voluntarios humanos en el <i>Anexo C</i> y el <i>Anexo F</i> .		
7 pruebas de sensibilización de la piel		
7.1 Elección de métodos de prueba		
Actualmente hay tres ensayos en animales disponibles para la determinación del potencial de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
sensibilización cutánea de los productos químicos. Estos incluyen dos ensayos en cobayos y un ensayo murino. Hasta ahora, los dos métodos más utilizados para las pruebas de sensibilización de la piel son la Prueba de Maximización en Cobayo (GPMT, <i>por sus siglas en inglés</i>) y la prueba de parche cerrado (prueba de Buehler). De estos, la prueba de maximización es el método más sensible. Véase la <i>referencia</i> [51]. La prueba de parche cerrado es adecuada para productos tópicos.		
El Ensayo de ganglios linfáticos locales murinos (LLNA, <i>por sus siglas en inglés</i>) fue aceptado internacionalmente para probar productos químicos individuales como una alternativa independiente a los ensayos en cobayos, y ahora es el ensayo preferido para productos químicos. Véanse las <i>referencias</i> [69] [88] [91]. En algunos casos, pueden ser necesarios ensayos en cobayos para la evaluación del potencial de sensibilización de ciertas muestras de prueba. Esto podría ser cierto en el caso de falsos negativos, falsos positivos, ciertos metales y sustancias de alto peso molecular, que no penetran en la piel. Uno debe ser consciente esa actividad irritante también puede dar lugar a respuestas positivas de los ganglios linfáticos.		
En vista de las disposiciones establecidas en MGA-DM 10993-2 sobre los requisitos de bienestar animal, se tendrá en cuenta el LLNA. Además de las consideraciones de bienestar		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
animal, el LLNA tiene la ventaja de proporcionar datos cuantitativos objetivos.		
Nota: Los tres ensayos se desarrollaron para la detección del potencial sensibilizador de la piel de los productos químicos, es decir, dermatitis de contacto, hipersensibilidad de tipo tardío (tipo IV).		
7.2 Ensayo de ganglios linfáticos locales murinos (LLNA)		
7.2.1 Principio		
Después del tratamiento tópico de una muestra de prueba en el dorso de las orejas, se mide el grado de proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan los sitios de aplicación (orejas). Una respuesta en la proliferación celular de tres veces o más en comparación con la actividad de los controles es el umbral para designar un material de prueba como sensibilizador.		
El LLNA se realizará utilizando un enfoque de respuesta a la dosis cuando se usan sustancias. Para productos finales / dispositivos médicos, puede ser suficiente probar solo el extracto sin diluir.		
Nota: La Bibliografía contiene publicaciones representativas de LLNA. Se alienta a los laboratorios que realizan este ensayo a revisar estas y otras publicaciones relevantes disponibles. Además, actualmente se están desarrollando alternativas <i>in vitro</i> para el LLNA. Para obtener información actualizada sobre estos desarrollos, se proporcionan referencias a los sitios web de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
ECVAM, ICCVAM y JaCVAM en la Bibliografía. Véanse las <i>referencias</i> [114] [115] [116]).		
7.2.2 Preparación de la muestra de prueba		
La muestra de prueba debe ser un líquido, suspensión, gel o pasta de modo que pueda aplicarse a las orejas de los ratones.		
Siempre que sea posible, se investigará una serie de dosis (diluciones). De lo contrario, se debe utilizar la concentración más alta preparada como solución o suspensión química o como extracto. La toxicidad sistémica y la irritación cutánea local excesiva pueden invalidar los resultados de la prueba; Por lo tanto, estas reacciones deben evitarse. En ciertas circunstancias, la prueba previa puede ser necesaria.		
Un vehículo comúnmente utilizado para sustancias / productos químicos es una mezcla 4:1 de aceite de oliva acetona. Las muestras líquidas que son hidrófilas y / o no se adhieren adecuadamente a la piel del oído deben modificarse para adherirse al sitio de prueba. Esto puede obtenerse agregando un agente como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa (0.5 % p/v). Para productos químicos solubles en agua, se prefieren dimetilsulfóxido o dimetilformamida sobre el tensioactivo Pluronic® L92. Véase la <i>referencia</i> [89]. Alternativamente, se pueden usar otros vehículos de extracción, como se mencionó. Véase la <i>referencia</i> [88]. El efecto de las adiciones a los medios de extracción y / o cambios en la composición del vehículo se validará y		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
documentará. Esto podría hacerse mediante experimentos con sensibilizadores débiles a moderados tan comúnmente utilizados como control positivo. Además, se puede realizar una adición de la muestra de prueba con un control positivo para demostrar que el extracto preparado aún puede detectar la presencia de posibles sensibilizadores. Los métodos de extracción se describen en el MGA-DM 10993-12.		
Para cada administración, se preparará un extracto por separado.		
Nota: Para los polímeros, en el <i>Anexo E</i> se proporciona información sobre un método específico para la preparación de extractos.		
7.2.3 Animales y cría		
Se utilizarán ratones hembra sanos de la cepa CBA / Ca o CBA / J, a menos que se valide otra cepa. Véanse las referencias [88] [96]. Se ha informado que varias cepas de ratones son aceptables (DBA / 2, B6C3F1, BALB / c). Véase la referencia [90]. Los ratones no estarán preñados y tendrán entre ocho y doce semanas de edad; los ratones en cada estudio deberán tener la misma edad (dentro de un rango de edad de una semana). Se pueden usar ratones machos si se demuestra que son equivalentes al nivel de sensibilidad de las hembras.		
La cría y la selección de animales deben estar de acuerdo con MGA-DM 10993-2. Los ratones, habitualmente aclimatados al laboratorio, se		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
identificarán individualmente. Para ciertas muestras de prueba, la vivienda individual puede ser necesario. Esto deberá estar justificado y documentado.		
Nota: Cuando se realiza alojamiento grupal, se debe tener en cuenta la contaminación cruzada y la ingesta oral no deseada.		
7.2.4 Procedimiento de prueba		
Para los productos químicos, el LLNA generalmente se realiza de manera dosis-respuesta. Para dispositivos médicos, las muestras a analizar pueden ser extractos. En estos casos, solo una dosis única está disponible para la prueba. En general, el extracto puede investigarse sin diluir. Sin embargo, cuando el extracto contiene componentes altamente tóxicos, esto puede dar como resultado una respuesta negativa en el LLNA debido a la toxicidad. Por lo tanto, cuando se investigan extractos altamente tóxicos (Véase el MGA-DM 10993-5), se recomienda realizar el LLNA de forma dosis-respuesta y diluir el extracto.		
Para garantizar la reproducibilidad y la sensibilidad del procedimiento de prueba, pruebas con alérgenos de contacto débiles a moderados conocidos, p. Ej. mercaptobenzotiazol, aldehído hexil cinámico y benzocaína, se incluirán en cada ensayo. Los ejemplos mencionados pueden no ser adecuados para cada vehículo utilizado para la preparación de muestras (es decir, vehículo a base de agua); en tales casos, podría		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
seleccionarse otro control positivo. Esto deberá estar justificado y documentado. Cuando el ensayo se realiza con frecuencia, no es necesario incluir controles positivos en cada ensayo, sin embargo, deben incluirse al menos una vez cada seis meses.		
Los pesos corporales individuales se registrarán al inicio y al final del estudio. Con el fin de detectar la posible toxicidad de la muestra de ensayo, la observación clínica se realizará y registrará durante el estudio.		
Nota: El uso de un control positivo solo una vez cada seis meses puede tener consecuencias para los resultados obtenidos en el período de seis meses anterior cuando este control positivo muestra un resultado negativo. La referencia [88] establece que las pruebas periódicas (es decir, a intervalos de 6 meses) de la sustancia de control positivo pueden considerarse en laboratorios que realizan el LLNA regularmente (es decir, realizan el LLNA a una frecuencia no menor de una vez al mes) y que una historia y una habilidad documentada para obtener resultados consistentes con controles positivos. Es importante darse cuenta de que la decisión de incluir solo un control positivo periódicamente en lugar de concurrentemente podría tener ramificaciones en la adecuación y aceptabilidad de los resultados negativos del estudio generados sin un control positivo concurrente durante el intervalo entre cada estudio periódico de control positivo.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en la prueba periódica de control positivo, todos los resultados negativos de la sustancia de prueba obtenidos en el intervalo entre la última prueba de control positivo periódica aceptable y la prueba de control positivo periódica inaceptable podrían cuestionarse. Con el fin de demostrar que los resultados de la sustancia de prueba negativa anterior son aceptables, se podría esperar que un laboratorio repita todas las pruebas negativas, lo que requeriría gastos adicionales y un mayor uso de animales.		
7.2.5 Grupos de tratamiento		
Cuando se realiza el LLNA, los datos de un mínimo de cuatro ratones por grupo estarán disponibles para evaluación. Las respuestas de los ganglios linfáticos pueden determinarse por medición individual o por medición de muestras agrupadas de ganglios linfáticos. Para el análisis estadístico, se prefiere la medición individual.		
Cuando solo una dosis única está disponible para evaluación, por ejemplo, un extracto, se utilizará un mínimo de cinco ratones para cada grupo, cuando se miden las respuestas individuales.		
Los grupos de tratamiento se asignarán a:		
– Un blanco de cada tipo de vehículo empleado (véase el Anexo A);		
– cuando sea apropiado, control positivo para cada vehículo empleado;		
– grupos de prueba para cada vehículo de extracto empleado.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Cuando se prueba un solo químico o sustancia, el LLNA se debe realizar de una manera dosis-respuesta. Para otros tipos de pruebas y extractos similares a muestras, una evaluación dosis-respuesta podría no ser factible. Cuando solo se emplea un grupo de prueba, esto debe estar justificado y documentado.		
Nota: Cuando se hayan recopilado suficientes datos para demostrar la consistencia de la respuesta a la dosis del control positivo, se puede incluir una dosis única para demostrar la sensibilidad del ensayo. Véase la Referencia [88].		
La muestra apropiada se aplicará en el lado dorsal de ambas orejas de los ratones designados a una dosis de 25 µL / d durante tres días consecutivos. Cada día, observe los oídos en busca de signos de irritación que puedan interferir con los resultados de interpretación. Véanse las referencias [73] [82] [84].		
7.2.6 Determinación de la proliferación celular y la preparación de tejidos		
Las células en proliferación en los ganglios linfáticos de drenaje pueden marcarse mediante un marcador radiactivo o fluorescente. Los radiomarcadores comúnmente utilizados son 3H-metil timidina y 125I-yododesoxiuridina, mientras que para fluorescencia se puede usar fluorodeoxiuridina.		
A las 72 ± 2 h después del último tratamiento, registre los pesos individuales de los ratones y administre por vía intravenosa la etiqueta para la		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
proliferación celular. Inyecte 0.25 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 20 μ Ci (740 KBq) de unidades de radioactividad de 3H-metil timidina en todos los ratones de prueba y control a través de la vena de la cola. Para 125I-yododexiuridina, inyecte 0,25 mL de PBS que contenga 2 μ Ci (74 KBq), y para fluorodesoxiuridina inyecte 0.25 mL que contengan 10–5 mol/L en la vena de la cola. Véase la referencia [88].		
Existen otros procedimientos alternativos que no requieren radiomarcaje y pueden usarse cuando esté justificado [p. bromodeoxiuridina BrdU, determinación de adenosina trifosfato (ATP) (método DA)].		
Nota 1: para más información, véanse las referencias [88] [91] [100] [114].		
La eutanasia de los ratones 5 ± 0.75 h después de la administración de la solución de etiquetado. Retire el ganglio linfático auricular que drena. Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada de las muestras de tejido. Se pueden agrupar los ganglios linfáticos de cada grupo, o se pueden agrupar pares de ganglios linfáticos de cada animal individual. Las preparaciones de células individuales se preparan presionando suavemente los ganglios linfáticos a través de una malla de alambre de acero inoxidable de 200 μ m o malla de nailon. Se prefieren los datos de cada animal individual ya que proporciona la variabilidad entre cada animal en un grupo. Las preparaciones		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
celulares se lavan dos veces por centrifugación y se resuspenden en PBS. Las células se precipitan con ácido tricloroacético (TCA) al 5 % a 4 ± 2 °C durante 18 ± 1 h. Después de una centrifugación final, los sedimentos por etapas se resuspenden en 1 mL de TCA y se transfieren a viales de centelleo que contienen 10 mL de fluido de centelleo para el recuento de 3H, o se transfieren directamente a un contador gamma para el recuento de 125I. Véase la referencia [70] [90] [91].		
Nota 2: alternativamente, el marcado y la determinación de la proliferación celular pueden realizarse <i>ex vivo</i> . Véanse las referencias [92] [93].		
7.2.7 Resultados e interpretación		
Mida el nivel de radioactividad en las células de los ganglios linfáticos en cuentas por minuto por ratón (cpm / ratón). Convierta las cuentas por minuto (cpm) en desintegración por minuto (dpm). Calcule la media y la desviación estándar (solo para el método de muestreo individual) de cpm o dpm para cada grupo de ratones. Véase la referencia [88]. Resta el valor de fondo de cada resultado.		
Determine el índice de estimulación (SI) dividiendo la prueba cpm o dpm por el blanco cpm o dpm. Un SI de tres o más (≥ 3.0) se considerará positivo para designar una muestra de prueba como sensibilizador. Véase la Referencia [64].		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Las muestras de control positivo producirán un SI de $\geq 3,0$.		
Para un estudio válido, el control positivo se llevará a cabo simultáneamente o dentro de los seis meses anteriores. Véase la <i>referencia</i> [88].		
7.2.8 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de los materiales o dispositivos de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de la muestra o material de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado para preparar la muestra de prueba o el material o dispositivo de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) método de aplicación a los oídos;		
f) descripción del método para determinar la proliferación celular;		
g) registros de las observaciones, incluidas las observaciones clínicas y de peso corporal;		
h) evaluación de los resultados, incluido el control positivo.		
7.3 Ensayos en cobayo para la detección de sensibilización cutánea		
7.3.1 Principio		
Los dos ensayos en cobayos utilizados actualmente para la detección de la actividad sensibilizante de productos químicos y dispositivos médicos son el ensayo de Buehler y el GPMT. Ambos ensayos consisten en una fase de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
inducción y desafío, cubriendo así todas las etapas de hipersensibilidad.		
7.3.2 Elección de las concentraciones de muestra de prueba		
Las pautas actuales para probar el potencial de sensibilización de productos químicos individuales recomiendan usar solo una concentración para la prueba.		
Nota: La información sobre un método específico para la preparación de extractos de materiales de prueba poliméricos se proporciona en el <i>Anexo E</i> .		
7.3.3 Inducción		
La tasa de sensibilización depende en gran medida de la dosis de inducción, que en los ensayos con cobayos debe ser de leve a moderadamente irritante, cuando sea posible. Si no se alcanza el umbral de irritación, se utilizará la concentración más alta posible. Sin embargo, no interferirá con la salud de los animales. La dosis de inducción en los ensayos en cobayos normalmente se selecciona en base a pruebas preliminares como se describe para las pruebas individuales en cobayos. Los extractos sin diluir con los disolventes habituales para la dosificación parenteral no necesitan someterse a una prueba preliminar.		
7.3.4 Desafío		
La concentración de desafío en los ensayos en cobayos también se basa en pruebas preliminares en animales previamente no expuestos al material de prueba. Se utilizará la dosis no irritante más		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
alta, según lo determinado en las evaluaciones previas a la prueba. Se recomienda el uso de más de una concentración para el procedimiento de desafío, a fin de facilitar la evaluación de los resultados (Véase el punto F.2).		
7.4 Factores importantes que afectan el resultado de la prueba		
Las características bioquímicas y físicas de la muestra de prueba pueden influir en la elección de la prueba, ya que la prueba de maximización requiere inyecciones intradérmicas. Si la muestra de prueba no puede inyectarse por vía intradérmica, se utilizará un método alternativo. Las soluciones de extracto se prepararán en condiciones asépticas. Las soluciones no estériles no deben utilizarse para aplicaciones intradérmicas.		
La biodisponibilidad del material de prueba está influenciada por la elección del vehículo. Aunque no existe un vehículo que sea óptimo para todos los materiales, debe seleccionarse un vehículo que optimice la exposición por solubilización y penetración. La concentración del material de prueba debe ser la más alta posible sin afectar la interpretación de los resultados. La mayoría de los investigadores prefieren la muestra de prueba como solución porque las dispersiones son propensas a formar un sedimento, lo que dificulta la dosificación exacta. Ejemplos de vehículos para inyección intradérmica incluyen solución salina, propilenglicol y aceites vegetales.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
La variación entre los resultados de diferentes laboratorios puede tener varias fuentes. Los siguientes factores en el procedimiento de prueba son importantes:		
– condiciones de pruebas ambientales;		
– sitio de prueba en el animal;		
– método de depilación (recorte / afeitado o depilación química);		
– tipo de diseño de parche;		
– cantidad de material de prueba;		
– calidad de la oclusión;		
– Tiempo de exposición y lectura de los animales.		
La capacidad de respuesta de los animales también varía según los factores genéticos y la cría.		
La comparación del número de animales de prueba que tienen una respuesta positiva en el desafío con los controles apropiados es esencial para indicar el resultado positivo de la prueba, aunque la gravedad de la reacción ayudará en la interpretación. Las reacciones límite en el desafío se aclaran mejor con el rechazo. No se ha demostrado que la histopatología sea de ayuda en la evaluación de los resultados de las pruebas.		
Los ensayos con controles positivos se realizarán periódicamente para garantizar la reproducibilidad y la sensibilidad del procedimiento de prueba. Los controles positivos deben ser preferiblemente alérgenos de contacto débiles a moderados, p. Ej. mercaptobenzotiazol, aldehído hexil cinámico y		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
benzocaína. Los controles positivos se realizarán al menos una vez cada seis meses. Véase la referencia [6].		
Nota: Para obtener una respuesta positiva, se pueden utilizar diluciones de sensibilizadores moderados a fuertes (por ejemplo, formaldehído y DNCB). Sin embargo, esto no garantiza que el ensayo también pueda identificar respuestas de sensibilizadores débiles en extractos de dispositivos médicos.		
7.5 Prueba de maximización en cobayo		
7.5.1 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir sensibilización de la piel en el cobayo utilizando la técnica aplicada para productos químicos individuales en la prueba de maximización en cobayo.		
7.5.2 Preparación de la muestra de prueba		
La muestra de prueba debe prepararse como se especifica en el Anexo A. La concentración de la muestra de prueba debe ser la más alta posible sin afectar la interpretación de los resultados (Véase el punto 7.5.4.2).		
Nota: la información sobre polímeros sobre un método específico para la preparación de extractos se presenta en el Anexo E.		
7.5.3 Animales y cría		
Se utilizarán cobayos albinos adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa, que pesen 300 g a 500 g al comienzo de la prueba. Si		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
se utilizan animales hembras, serán nulíparos y no preñados.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el MGA-DM 10993-2. Las pruebas preliminares, cuando sea necesario, deben llevarse a cabo en un grupo de animales para determinar las concentraciones óptimas de prueba. (véase el punto 7.5.4.2).		
Si el material de prueba es polvo o líquido, se tratará un mínimo de diez animales con la muestra de prueba y un mínimo de cinco animales actuará como grupo de control. Si se necesita una prueba preliminar, se realizará en animales adicionales.		
Para los extractos de prueba, se tratará un mínimo de diez animales con la muestra de prueba y un mínimo de cinco animales actuarán como grupo de control de solventes. Si se necesita una prueba preliminar, se realizará en animales adicionales.		
Si las pruebas en diez animales de prueba y cinco de control son completamente negativas, es poco probable que las pruebas de otros diez más cinco animales den resultados positivos. Sin embargo, si se desarrolla alguna respuesta equívoca, se realizará un nuevo desafío (véase 7.5.6). Si quedan respuestas equívocas, realice un nuevo estudio con un mínimo de 20 animales de prueba y diez de control.		
7.5.4 Procedimiento de prueba		
7.5.4.1 Preparación		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Recorte y afeite el pelaje en todos los sitios de tratamiento antes de todos los pasos del procedimiento de prueba.		
Para inyecciones intradérmicas, inyecte 0.1 mL por sitio.		
Para la aplicación tópica, sature un papel de filtro apropiado o un parche de gasa absorbente (4 a 8 cm ²) con la muestra de prueba y aplique el parche a la piel recortada debajo de un vendaje oclusivo asegurado por una envoltura alrededor del torso del animal.		
Nota: al envolver a un animal para asegurar un vendaje oclusivo, se debe tener cuidado para permitir la respiración normal del animal. Se prefiere una envoltura flexible, que debe ser aplicada por personal bien capacitado.		
7.5.4.2 Pruebas preliminares		
Las pruebas preliminares están destinadas a determinar la concentración de la muestra de prueba que se utilizará en la prueba principal en 7.5.4.3.		
Los extractos sin diluir que usan los solventes usuales no necesitan ser sometidos a pruebas preliminares.		
Aplicar tópicamente un rango de diluciones de la muestra de prueba a los flancos de al menos tres animales. Retire los apósitos y parches oclusivos después de 24 h, y evalúe los sitios de aplicación para eritema y edema utilizando la escala de clasificación de Magnusson y Kligman que se proporciona en la <i>tabla 4</i> .		

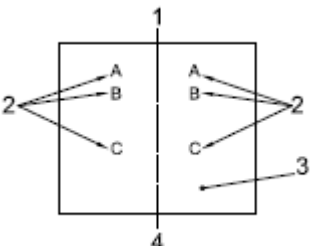
"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Para la fase de inducción tópica en la prueba principal, seleccione la concentración más alta que cause eritema leve a moderado pero que no afecte negativamente al animal. Debe reconocerse que, para extractos de dispositivos médicos, no se puede obtener el umbral irritante. En tales casos, se utilizará la concentración más alta posible, por ejemplo. El extracto sin diluir. Para productos terminados/ dispositivos médicos, puede ser suficiente probar solo el extracto sin diluir.		
Para la fase de desafío en la prueba principal, seleccione la concentración más alta que no produzca eritema.		
<i>Tabla 4. Escala de Magnusson y Kligman</i>		
Reacción de prueba de parche Sin cambio visible Eritema discreto o irregular Eritema moderado y confluyente Eritema intenso y / o hinchazón	Escala de calificación 0 1 2 3	
Se debe considerar el pretratamiento de todos los animales mediante inyección con adyuvante completo (FCA) de Freund para evaluar la posibilidad de un estado hiperreactivo de la piel durante la prueba principal y, por lo tanto, la interferencia con las lecturas.		
7.5.4.3 Prueba principal		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
7.5.4.3.1 Fase de inducción intradérmica		
Realice un par de inyecciones intradérmicas de 0.1 ml de cada uno de los siguientes, en cada animal, en los sitios de inyección (A, B y C), como se muestra en la <i>figura 3</i> , en la región intraescapular recortada.		
Sitio A: Una emulsión estable de relación de volumen 50:50 del adyuvante completo de Freund mezclado con el disolvente elegido.		
Use solución salina fisiológica (BP, USP o equivalente) para materiales solubles en agua.		
Sitio B: La muestra de prueba (extracto sin diluir); inyectar los animales de control con el disolvente solo.		
Sitio C: la muestra de prueba a la concentración utilizada en el sitio B, emulsionada en una proporción de volumen de 50:50 en emulsión estable del adyuvante completo de Freund y el solvente (50 %); inyectar a los animales de control con una emulsión del líquido en blanco con adyuvante.		
7.5.4.3.2 Fase de inducción tópica		
A (7 ± 1) días después de completar la fase de inducción intradérmica, administre la muestra de prueba por aplicación tópica en la región intraescapular de cada animal, usando un parche de área de aproximadamente 8 cm ² (papel de filtro o gasa absorbente), para cubrir los sitios de inyección intradérmica (<i>figura 3</i>). Use la concentración seleccionada en 7.5.4.3.1 para el sitio B. Si la concentración máxima que se puede		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
lograr en 7.5.4.3.1 no produce irritación, prepare el área con 10 % de dodecil sulfato de sodio masajeado en la piel 24 ± 2 h antes de aplicar el parche. Asegure los parches con un vendaje oclusivo. Retire los apósitos y parches después de 48 ± 2 h.		
Se prefieren extractos recién preparados. Si un extracto se almacena más de 24 ± 2 h, entonces se debe verificar la estabilidad del extracto bajo las condiciones de almacenamiento.		
Trate a los animales de control de manera similar, usando solo el líquido en blanco.		
		
Donde:		
1 extremo craneal		
2 inyecciones intradérmicas de 0.1 mL (Véase el punto 7.5.4.3.1)		
3 regiones intraescapulares recortadas		
4 extremo caudal		
Figura 3. Ubicación de los sitios de inyección intradérmica		
7.5.4.3.3 Fase de desafío		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
A los 14 ± 1 días después de completar la fase de inducción tópica, desafíe a todos los animales de prueba y control con la muestra de prueba. Administre la muestra de prueba y un blanco por aplicación tópica a los sitios que no fueron tratados durante la etapa de inducción, como el flanco superior de cada animal, utilizando parches o cámaras apropiados empapados en la muestra de prueba a la concentración seleccionada en el punto 7.5.4.3.1 para el sitio C. Las diluciones de esta concentración también podrían aplicarse a otros sitios no tratados de manera similar. Asegure con un vendaje oclusivo. Retire los apósitos y parches después de 24 ± 2 h.		
7.5.5 Observación de animales		
Observe la apariencia de los sitios de piel de desafío de los animales de prueba y control 24 ± 2 h y 48 ± 2 h después de retirar los apósitos. Se recomienda el uso de iluminación natural o de espectro completo para visualizar las reacciones de la piel. Describa y califique las reacciones cutáneas de eritema y edema según la clasificación de Magnusson y Kligman se da en la Tabla 4 para cada sitio de desafío y en cada intervalo de tiempo. Se recomienda encarecidamente que la lectura se realice sin conocer el tratamiento, a fin de minimizar el sesgo en la evaluación de los resultados.	el	
7.5.6 Evaluación de resultados		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Los grados de Magnusson y Kligman de 1 o más en el grupo de prueba generalmente indican sensibilización, siempre que se vean grados de menos de 1 en los animales de control. Si se observan grados de 1 o más en los animales de control, se supone que las reacciones de los animales de prueba que exceden la reacción más severa en los animales de control se deben a la sensibilización. Si la respuesta es equívoca, se recomienda un nuevo desafío para confirmar los resultados del primer desafío. El resultado de la prueba se presenta como la frecuencia de los resultados positivos del desafío en animales de prueba y control.		
Ocasionalmente, el grupo de prueba tiene una mayor cantidad de animales que muestran una respuesta que los controles, aunque la intensidad de la reacción no es mayor que la exhibida por los controles. En estos casos, puede ser necesario un nuevo desafío para definir la respuesta claramente. Un nuevo desafío se llevará a cabo 1 a 2 semanas después del primer desafío. El método utilizado será el descrito para el primer desafío, utilizando un lado ingenuo del animal.		
7.5.7 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de los materiales o dispositivos de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de la muestra o material de prueba;		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
c) una descripción detallada del método empleado para preparar la muestra de prueba o el material o dispositivo de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de aplicación a los sitios de prueba;		
f) cómo se marcaron los sitios y las lecturas realizadas;		
g) registros de las observaciones;		
h) evaluación de los resultados.		
7.6 Prueba de parche cerrado (prueba de Buehler)		
7.6.1 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir sensibilización de la piel en cobayos.		
7.6.2 Preparación de la muestra de prueba		
La muestra de prueba debe prepararse como se especifica en el Anexo A. La concentración de la muestra de prueba debe ser la más alta posible sin afectar la interpretación de los resultados (véase el punto 7.6.4.2). Cuando la forma y el tamaño lo permitan, los dispositivos tópicos (por ejemplo, electrodos) pueden usarse tal como están.		
7.6.3 Animales y cría		
Deben ser cobayos albinos adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa de cría, con un peso de 300 a 500 g al comienzo del ensayo. Si se		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
utilizan animales hembras, serán nulíparos y no preñados.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el MGA-DM 10993-2. Se deben realizar pruebas preliminares en un conjunto de animales para determinar las concentraciones de la muestra de prueba (véase el punto 7.5.4.2).		
Para analizar polvos o líquidos, se tratará un mínimo de diez animales con el material de prueba y un mínimo de cinco animales actuará como grupo de control. Si se necesita una prueba preliminar, se realizará en animales adicionales.		
Para los extractos de prueba, se tratará un mínimo de diez animales con cada extracto y un mínimo de cinco animales actuarán como control para cada solvente. Si se necesita una prueba preliminar, se realizará en animales adicionales.		
Si las pruebas en diez animales de prueba y cinco de control son completamente negativas, es poco probable que las pruebas de otros diez más cinco animales den resultados positivos. Sin embargo, si se desarrolla alguna respuesta equívoca, se realizará un nuevo desafío (Véase el punto 7.5.6). Si quedan respuestas equívocas, realice un nuevo estudio en un mínimo de 20 pruebas y diez animales de control.		
7.6.4 Procedimiento de prueba		
7.6.4.1 Preparación		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Recorte o afeite la piel en todos los sitios de tratamiento antes de todos los pasos del procedimiento de prueba.		
Para todas las aplicaciones tópicas, sature un parche (papel de filtro o gasa absorbente) de las dimensiones apropiadas con el material de prueba o extracto y aplique el parche al área recortada debajo de un vendaje oclusivo durante 6 ± 0.5 h. La restricción para cada animal podría usarse para asegurar la oclusión de los sitios de prueba. Si se utiliza envoltura, se debe evaluar su adecuación en cada experimento.		
Nota: Al envolver a un animal para asegurar un vendaje oclusivo, se debe tener cuidado para permitir la respiración normal del animal. Se prefiere una envoltura flexible, que debe ser aplicada por personal bien capacitado.		
7.6.4.2 Pruebas preliminares		
Las pruebas preliminares están destinadas a determinar las concentraciones de la muestra de prueba que se utilizará en la prueba principal descrita en el <i>punto 7.6.4.3</i> .		
Los dispositivos médicos destinados al uso tópico y los extractos sin diluir que usan los solventes habituales no necesitan ser sometidos a pruebas preliminares.		
Aplique tópicamente cuatro concentraciones de la muestra de prueba en los flancos de cada uno de al menos tres animales usando parches apropiados. Retire los apósitos y parches oclusivos después de 6 ± 0.5 h. Evalúe los sitios		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
de aplicación para eritema y edema utilizando la clasificación Magnusson y Kligman que se proporciona en la <i>tabla 4</i> a las 24 ± 2 h y 48 ± 2 h después de la extracción del parche		
Seleccione:		
a) para la fase de inducción en la prueba principal, la concentración más alta que no causa más que un ligero eritema pero que no afecta negativamente a los animales;		
b) para la fase de desafío en la prueba principal, la concentración más alta que no produce eritema.		
7.6.4.3 Prueba principal		
7.6.4.3.1 Fase de inducción		
Administre la muestra de prueba por aplicación tópica en la región recortada superior izquierda posterior de cada animal usando parches apropiados empapados en la muestra de prueba a la concentración seleccionada en 7.6.4.2 a). Retire el inmovilizador de los apósitos y parches oclusivos después de 6 ± 0.5 h. Realice este procedimiento tres días a la semana durante tres semanas. Trate a los animales de control de manera similar, usando solo el líquido en blanco.		
7.6.4.3.2 Fase de desafío		
A los 14 ± 1 días después de la última aplicación de inducción, desafíe a todos los animales de prueba y control con la muestra de prueba.		
Administre la muestra de prueba mediante una sola aplicación tópica en un área cortada no probada de cada animal usando parches		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
apropiados empapados en la muestra de prueba a la concentración seleccionada en 7.6.4.2 b). Retire el dispositivo de retención y los apósitos y parches oclusivos después de 6 ± 0.5 h.		
7.6.5 Observación de animales		
A las 24 ± 2 h después de la exposición primaria de desafío o reexposición, ya sea		
a) depilar a todos los animales con un depilatorio comercial colocando el material en el sitio de prueba y las áreas circundantes de acuerdo con las instrucciones del fabricante o b) afeitar a todos los animales en los sitios de desafío y las áreas circundantes.		
Lave a fondo el área depilada con agua tibia y seque los animales con una toalla antes de devolverlos a sus jaulas. Un mínimo de 2 h después de la eliminación del vello, califique los sitios de prueba usando la escala dada en la <i>tabla 4</i> .		
Repita la clasificación 48 ± 2 h después de retirar el parche de desafío. Se recomienda el uso de iluminación natural o de espectro completo para visualizar las reacciones de la piel. Se recomienda encarecidamente que la lectura se realice sin conocer el tratamiento, a fin de minimizar el sesgo en la evaluación de los resultados.		
7.6.6 Evaluación de resultados		
Se aplica la escala de calificación de Magnusson y Kligman dada en la <i>tabla 4</i> .		
Los grados de 1 o más en el grupo de prueba generalmente indican sensibilización, siempre que		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
se vean grados de menos de 1 en los animales de control. Si se observan grados de 1 o más en los animales de control, se supone que las reacciones de los animales de prueba que exceden la reacción de control más severa se deben a la sensibilización. Una reexposición se recomienda para confirmar los resultados del primer desafío. El resultado de la prueba se presenta como la frecuencia de los resultados positivos del desafío en animales de prueba y control.		
Ocasionalmente, el grupo de prueba tiene una mayor cantidad de animales que muestran una respuesta que los controles, aunque la intensidad de la reacción no es mayor que la exhibida por los controles. En estos casos, puede ser necesario un nuevo desafío para definir claramente la respuesta. Un nuevo desafío se llevará a cabo 1 semana a 2 semanas después del primer desafío. El método utilizado será el descrito para el primer desafío, utilizando un área no probada en el costado del animal.		
En estas situaciones, se recomienda un nuevo grupo de control negativo.		
7.6.7 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de los materiales o dispositivos de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de los materiales o dispositivos de prueba;		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras y materiales de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de aplicación a los sitios de prueba;		
f) cómo se marcaron los sitios y las lecturas realizadas;		
g) registros de las observaciones;		
h) evaluación de los resultados, incluidos los métodos estadísticos.		
8 factores clave en la interpretación de los resultados de la prueba		
Las pruebas incluidas en este MGA-DM son herramientas importantes para el desarrollo de productos seguros, siempre que sean ejecutadas e interpretadas por personal capacitado.		
La evidencia de irritación y sensibilidad de la piel por cualquier método no excluye necesariamente el uso del material o dispositivo de prueba porque la cantidad de material de prueba en el procedimiento de prueba puede ser exagerada en comparación con las condiciones reales de uso. Un hallazgo adverso usando cualquiera de los procedimientos descritos indica la necesidad de un análisis adicional que permita evaluar el riesgo de exposición humana prevista.		
Los resultados de las pruebas predictivas generadas por los procedimientos descritos en este MGA-DM no pueden ser independientes. Un resultado negativo no siempre excluye la		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
posibilidad de que un producto pueda causar reacciones alérgicas en la piel. Los resultados de las pruebas positivas y negativas en cualquiera de los ensayos deben ser analizados mediante un seguimiento riguroso para minimizar la probabilidad de resultados falsos positivos o falsos negativos. Los resultados deben ser validados por comparación con otras fuentes de información, como:		
— datos de quejas de la industria y del consumidor;		
— experiencia con dispositivos que contienen componentes similares;		
— resultados de pruebas de diagnóstico en clínicas dermatológicas;		
datos epidemiológicos retrospectivos.		
Anexo A		
(Normativo)		
Preparación de materiales para pruebas de irritación / sensibilización.		
A.1 General		
La realización de las pruebas y la interpretación de los datos de las pruebas de irritación / sensibilización deberán tener en cuenta la naturaleza, el grado, la frecuencia, la duración y las condiciones de exposición del dispositivo médico en humanos. Uno de los parámetros críticos para estas pruebas es la preparación del material de prueba.		
A.2 Materiales para exposición por contacto directo		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
A.2.1 Materiales de prueba sólidos		
Los materiales sólidos que tienen estados físicos apropiados (por ejemplo, láminas, películas) se someterán a prueba sin modificaciones. Prepare muestras de 2.5 cm × 2.5 cm y de un grosor que se aproxime al uso normal pero no sea superior a 0.5 cm. Prepare muestras de control negativo adecuadas de la misma manera. El control negativo debe parecerse físicamente al material de prueba y no debe ser irritante. Se puede usar una gasa absorbente como sustituta si no se puede identificar un control más adecuado		
El sólido puede pulverizarse, teniendo cuidado de garantizar que no se produzca contaminación durante este proceso, o humedecido suficientemente con agua o un disolvente no irritante adecuado para garantizar un buen contacto con los tejidos. En el caso de las cerámicas donde se requiere pulverización, recuerde que las propiedades fisicoquímicas de la cerámica pueden alterarse reduciendo la cerámica a polvo, con efectos potencialmente marcados sobre la actividad biológica.		
Los polvos (por ejemplo, superabsorbentes) se someterán a ensayo mediante deposición directa o haciendo una pasta en un disolvente apropiado. Se evaluará un control que use el mismo solvente en paralelo con el material de prueba humedecido, diluido o suspendido.		
Nota: El área de superficie y / o el tamaño de partícula son factores importantes en las		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
respuestas biológicas, como la fagocitosis, que desempeña un papel importante en las respuestas inflamatorias e inmunes.		
A.2.2 Materiales de prueba líquidos.		
Los líquidos se analizarán sin diluir por deposición directa o, si no es práctico, se diluirán con un solvente apropiado. Un control que use el mismo solvente se evaluará en paralelo con el líquido de prueba diluido.		
A.3 Extractos de materiales de prueba.		
Un sólido puede probarse preparando extractos del sólido. Si se prueban los extractos, se prepararán como se describe en el <i>MGA-DM 10993-12</i> , utilizando solventes polares, no polares y / o adicionales cuando sea apropiado. Se debe proporcionar una justificación para la idoneidad de un método de extracción.		
Se evaluará una muestra en blanco, utilizando el disolvente de extracción, en paralelo con el extracto del material de ensayo.		
A.4 Disolventes		
Si el material de prueba tiene que ser extraído, diluido, suspendido o humedecido, se utilizará un solvente no irritante adecuado. <i>MGA-DM 10993-12</i> proporciona una lista de solventes apropiados.		
A.5 Materiales de prueba estériles.		
Si el producto final se suministra en condiciones estériles, el material de prueba se esterilizará utilizando el mismo proceso antes de la prueba. Los productos esterilizados por óxido de etileno		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
presentan una dificultad técnica porque el óxido de etileno y sus productos de reacción pueden producir una respuesta biológica en las pruebas descritas en este MGA-DM.		
Para permitir la diferenciación entre los efectos producidos por el material de prueba y los producidos por los residuos de óxido de etileno cuando se observa una reacción irritante, se deben considerar las evaluaciones de esta respuesta al dispositivo antes y después de la esterilización con óxido de etileno.		
Anexo B		
(Normativo)		
Pruebas especiales de irritación.		
B.1 General		
Existen las siguientes pruebas especiales de irritación. Estas pruebas son relevantes para dispositivos médicos destinados a aplicarse en áreas específicas. Si se utiliza, se proporcionará una justificación para la elección del método de prueba.		
B.2 Prueba de irritación ocular.		
B.2.1 General		
La prueba de irritación ocular solo debe considerarse si los datos de seguridad no pueden obtenerse por otros medios, y solo para materiales que entren en contacto con el ojo o el párpado.		
Recientemente, ICCVAM evaluó cuatro sistemas de prueba alternativos <i>in vitro</i> , dos de los cuales fueron suficientemente desarrollados para		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
reemplazar las pruebas <i>in vivo</i> en animales para identificar irritantes y corrosivos severos. Estos ensayos son el método de prueba de opacidad y permeabilidad corneal bovina (BCOP), y el método de prueba de ojo de pollo aislado (ICE). Véase la referencia [107]. Para irritantes débiles, todavía puede ser necesario un ensayo <i>in vivo</i> .		
B.2.2 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación ocular.		
B.2.3 Exclusión de la prueba		
Los materiales y / o productos finales que han demostrado corrosión definida o irritación severa en un estudio dérmico ya no se someterán a prueba de irritación ocular. Cualquier material que sea irritante para la piel o que tenga un pH ≤ 2.0 o ≥ 11.5 no debe analizarse, pero debe etiquetarse como un irritante potencial para los ojos.		
En casos excepcionales donde se necesita una mayor caracterización / evaluación del riesgo, podría ser necesario probar materiales que sean mínimamente irritantes. Estos casos deberán estar justificados y documentados.		
B.2.4 Material de prueba		
Si el material de prueba es un líquido, instilar 0.1 mL, sin diluir, en el saco conjuntival inferior de un ojo.		
Si el material de prueba es un producto sólido o granular, muélelo hasta obtener un polvo fino.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Cuando se compacta suavemente, inculcar esa cantidad que ocupa un volumen de 0.1 mL y no pesa más de 100 mg en el saco conjuntival inferior de un ojo.		
Nota: Algunos productos no son adecuados para realizar pruebas directamente en el ojo. El daño mecánico puede hacer que la prueba sea inútil.		
Si el material de prueba está contenido en una bomba de pulverización, expulsar e instilar 0.1 mL como para líquidos.		
Si el material de prueba está contenido en un contenedor de aerosol, examine por		
a) pulverizar una sola ráfaga de 1 s de duración a una distancia de 10 cm dirigida al ojo abierto o		
b) expulsar el aerosol en un recipiente frío y tratarlo como si fuera un líquido.		
Si el material de prueba es tal que solo se puede aplicar como un extracto, prepare los extractos como se describe en el Anexo A. Introduzca una alícuota de 0.1 mL del extracto en el saco conjuntival inferior de un ojo.		
En condiciones idénticas a las utilizadas anteriormente, prepare un líquido en blanco, utilizando el disolvente polar y el no polar, en ausencia del material de prueba.		
B.2.5 Animales y cría		
Se utilizarán conejos albinos adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa, con un peso de 2 a 3 kg.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en MGA-DM 10993-2.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Un animal se utilizará inicialmente para evaluar el material de ensayo. Una respuesta positiva bien definida (véase la <i>tabla B.1</i>) en un animal evita la necesidad de pruebas adicionales.		
Cuando no se observa respuesta para materiales sólidos o líquidos, se utilizará un mínimo de dos animales adicionales. Para los extractos, se utilizará un mínimo de dos animales adicionales por extracto.		
Si la respuesta en la prueba con el mínimo de tres animales es equívoca o no está clara, se considerarán pruebas adicionales.		
B.2.6 Procedimiento de prueba		
No más de 24 h antes del comienzo de la prueba, examine visualmente ambos ojos de cada conejo en busca de evidencia de anormalidad ocular. Si cualquiera de los ojos muestra alguna anormalidad, el conejo será reemplazado.		
Cuando se examinan los ojos, se puede usar fluoresceína sódica al 2 % BP para visualizar cualquier daño corneal. Se recomienda el uso de un oftalmoscopio, lámpara de hendidura manual u otro dispositivo adecuado.		
Instile la muestra de prueba como se especifica en <i>B.2.4</i> en un ojo.		
Después de la instilación, mantenga los párpados juntos durante aproximadamente 1 s.		
El ojo contralateral de cada animal sirve como control y debe tratarse con un líquido en blanco cuando se analiza un extracto.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Si se anticipa una exposición repetida al material y el material de prueba no ha demostrado una respuesta significativa en la prueba aguda, se puede realizar un estudio de exposición repetida. La exposición repetida solo se llevará a cabo después de completar la prueba de exposición aguda, después de al menos 72 ± 2 h. La duración de la exposición debe ser similar a la duración del uso del material / dispositivo de prueba en la situación clínica.		
B.2.7 Observación de animales.		
Para los animales que reciben una única instilación de material de prueba, examine ambos ojos de cada animal aproximadamente 1 ± 0.1 h, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la instilación.		
La observación prolongada puede ser necesaria si hay lesiones persistentes, para determinar el progreso de las lesiones o su reversión; esto no necesita exceder 21 días. La observación extendida no puede justificarse para animales con lesiones graves.		
Nota: la norma ISO 9394 ^[25] proporciona pautas para la prueba de lentes de contacto que requieren una exposición de 21 días durante 8 h por día. Esta es una excepción a las pautas.		
Califique y registre cualquier reacción observada de acuerdo con la escala para clasificar las lesiones oculares que se proporciona en la <i>tabla B.1</i> .		

"2021, Año de la Independencia"

Dice		Debe decir	Justificación*
Tabla B.1. Sistema para clasificar las lesiones oculares.			
Reacción	Calificación numérica		
1. Cornea			
Grado de opacidad (área más densa)			
Sin opacidad	0		
Áreas dispersas o difusas, detalles del iris claramente visibles	1 ^a		
Áreas translúcidas fácilmente discernibles, detalles del iris ligeramente oscurecidos	2 ^a		
Áreas opalescentes, sin detalles del iris visibles, tamaño de la pupila apenas perceptible	3 ^a		
Opaco, detalle del iris no visible	4 ^a		
Área de la córnea involucrada			
Un cuarto (o menos) no cero 0	0		
Más de un cuarto, pero menos de la mitad	1		
Más de la mitad, pero menos de las tres cuartas partes	2		
Más de tres cuartos, hasta el área completa	3		
2. Iris			
Normal			
Pliegues por encima de lo normal, hinchazón de congestión, inyección circuncorneal (cualquiera o todos o una combinación de estos), el iris aún reacciona a la luz (la reacción lenta es positiva)	1 ^a		
Sin reacción a la luz, hemorragia, destrucción grave (cualquiera o todos estos)	2 ^a		
3. Conjuntiva			

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Grado de opacidad (área más densa) Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar, excluyendo la córnea y el iris) Buques normales 0 Vasos definitivamente inyectados por encima de lo normal 1 Rojo carmesí más difuso, más profundo, vasos individuales no fácilmente discernibles 2^a Difuso rojo carnosos 3^a Quemosis Sin hinchazón 0 Cualquier hinchazón por encima de lo normal (incluye membrana nictitante) 1 Inflamación obvia con eversión parcial de las tapas 2^a Hinchazón con las tapas alrededor de medio cerrado 3^a Hinchazón con las tapas entre semicerradas y completamente cerradas. 4^a Descarga Sin descarga 0 Cualquier cantidad diferente a la normal (no incluye pequeñas cantidades observadas en el canto interno de animales normales) 1 Descarga con humectación de los párpados y pelos adyacentes a los párpados 2 Descarga con humectación de los párpados y pelos adyacentes a los párpados 3 *Un resultado positivo.		
Para los animales que reciben múltiples instilaciones de material de prueba, examine		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
ambos ojos de cada animal inmediatamente antes y aproximadamente 1 ± 0.1 h después de cada instilación.		
Si hay evidencia de irritación después del último tratamiento, las observaciones pueden extenderse. La observación extendida puede ser necesaria si hay compromiso corneal persistente u otra irritación ocular, para determinar el progreso de las lesiones y su reversibilidad.		
Califique y registre cualquier reacción observada de acuerdo con la <i>tabla B.1</i> .		
Retirar inmediatamente un animal del estudio y sacrificarlo humanamente si, en cualquier momento, muestra:		
Daño ocular muy grave (por ejemplo, desprendimiento y ulceración de la membrana conjuntival, perforación corneal, sangre o pus en la cámara anterior);		
– Descarga purulenta o manchada de sangre;		
– Ulceración corneal significativa.		
Retirar del estudio a cualquier animal que muestre los máximos efectos en el sistema de clasificación que figura en la <i>tabla B.1</i> , es decir.		
– Ausencia de reflejo de luz (respuesta iridial grado 2) u opacidad corneal (grado 4) sin evidencia de recuperación dentro de 24 ± 2 h.		
– Inflamación conjuntival máxima (quemosis grado 4 junto con enrojecimiento grado 3) sin evidencia de recuperación dentro de 48 ± 2 h y sacrificarlo humanamente.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
B.2.8 Evaluación de resultados		
Las diferencias entre los ojos de prueba y de control se caracterizarán y explicarán en términos del sistema de clasificación que figura en la <i>tabla B.1</i> .		
Exposición aguda		
Si el ojo tratado en más de una animal muestra un resultado positivo (calificaciones con notas al pie de página en la <i>tabla B.1</i>) en cualquiera de las observaciones, entonces el material se considera irritante para los ojos y no se requieren pruebas adicionales.		
Si solo uno de los tres ojos tratados muestra una reacción leve o moderada o las reacciones son equívocas, trate a otros animales.		
Cuando se han tratado más animales, el material de prueba se considera irritante para los ojos si más de la mitad de los ojos tratados en el grupo de prueba exhiben un resultado positivo (calificaciones con notas al pie de página en la <i>tabla B.1</i>) en cualquier etapa de la observación.		
Una reacción severa en un solo animal se considera suficiente para etiquetar el material como irritante para los ojos.		
Exposición continúa		
El material de prueba se considera irritante para los ojos si más de la mitad de los animales en el grupo de prueba exhiben un resultado positivo (notas a pie de página en la <i>tabla B.1</i>) en cualquier etapa de la observación.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
B.2.9 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de las muestras de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de las muestras de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de instilación;		
f) cómo se realizaron las lecturas oculares;		
g) un registro de las observaciones;		
h) evaluación de los resultados.		
B.3 Prueba de irritación de la mucosa oral.		
B.3.1 General		
La prueba de irritación oral solo se considerará para materiales con contacto previsto con el tejido oral y si los datos de seguridad no pueden obtenerse por otros medios.		
B.3.2 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación del tejido oral.		
B.3.3 Exclusión de la prueba		
Cualquier material que se muestre como irritante para la piel o los ojos o material con un $\text{pH} \leq 2.0$ o ≥ 11.5 no se analizará y se etiquetará como un potencial irritante del tejido bucal.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
En casos excepcionales donde se necesita una mayor caracterización / evaluación del riesgo, podría ser necesario probar materiales que sean irritantes o que tengan un pH fuera del rango mencionado anteriormente. Estos casos deberán estar justificados y documentados.		
B.3.4 Material de prueba		
Prepare los materiales de prueba de acuerdo con el Anexo A.		
B.3.5 Animales y cría		
Se utilizarán hámsteres sirios adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa de cría. Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en MGA-DM 10993-2.		
Además de lo anterior, cuando sea apropiado, ajuste a cada animal un collar adecuado de 3 a 4 mm de ancho, colocado alrededor del cuello para que permita la alimentación y la respiración normales, pero evite que el animal retire la bolita de algodón. Pese cada animal diariamente durante siete días durante el período de prueba. Examine cualquier animal que muestre una pérdida de masa corporal durante este período y ajuste su collar, si es necesario. Si el animal continúa perdiendo masa, excluirlo de la prueba.		
Inicialmente se utilizará un mínimo de tres animales para evaluar el material de ensayo.		
Nota: El uso de animales adicionales tratados con un material de control negativo o líquido en blanco puede ser apropiado.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Si la respuesta en la prueba inicial es equívoca o no está clara, se considerarán pruebas adicionales.		
B.3.6 Procedimiento de prueba		
Retire el collar de cada animal y ponga las bolsas en las mejillas. Lave las bolsas con solución salina fisiológica y examine cualquier anomalía.		
Para materiales de prueba sólidos, coloque una muestra (no mayor de 5 mm de diámetro) directamente en la bolsa de la mejilla.		
Para materiales de prueba líquidos o muestras de extracto, remoje una bolita de algodón en la muestra, registre el volumen absorbido y coloque una bolita en una bolsa de cada animal. Alternativamente, un volumen apropiado de una muestra puede enjuagarse en la bolsa de la mejilla.		
No se coloca ninguna muestra en la otra bolsa de la mejilla, que sirve como control. Los animales de control apropiados se ensayarán en paralelo.		
Cuando sea necesario, reemplace el collar y devuelva el animal a su jaula.		
La duración de la exposición será la esperada para el uso real del material, pero no menos de 5 min.		
Después de la exposición, retire el collar y la bolita de algodón y lave la bolsa con solución salina fisiológica, teniendo cuidado de no contaminar la otra bolsa.		
Para exposición aguda, repita el procedimiento anterior cada hora (± 0.1 h) durante 4 h.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Para las pruebas de exposición repetida, base el número de aplicaciones, su duración y su intervalo en el tiempo de exposición previsto en la situación clínica.		
B.3.7 Observación de animales.		
Examine las bolsas macroscópicamente después de retirar los gránulos y, si se requieren aplicaciones repetidas, inmediatamente antes de la siguiente dosis.		
Describa la apariencia de las bolsas de las mejillas para cada animal y califique las reacciones de la superficie de la bolsa para el eritema de acuerdo con el sistema dado en la <i>tabla B.2</i> para cada animal en cada intervalo de tiempo. Registre los resultados para el informe de prueba.		
A las 24 ± 2 h después del tratamiento final, examine las bolsas de las mejillas macroscópicamente, sacrifique humanamente a los hámsteres y retire muestras de tejido de áreas representativas de las bolsas. Colocar en un fijador apropiado antes del procesamiento para el examen histológico.		
<i>Tabla B.2.</i> Sistema de clasificación para reacciones orales y peneales.		
Reacción	Calificación numérica	
Formación de eritema y escara		
Sin eritema	0	
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1	
Eritema bien definido	2	
Eritema moderado	3	

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Eritema severo (enrojecimiento de remolacha) a formación que evita la clasificación del eritema Se deben registrar e informar otros cambios adversos de los tejidos.	escara 4	
B.3.8 Evaluación de resultados		
B.3.8.1 Evaluación macroscópica		
Compare la bolsa de la mejilla tratada con la bolsa de la mejilla en el lado contralateral y, si se incluye un grupo de control, con las bolsas de animales en el grupo de control.		
Se agregan las calificaciones (véase la <i>tabla B.2</i>) para cada observación y la suma se divide por el número de observaciones para determinar la calificación promedio por animal.		
Nota 1: estas observaciones pueden ayudar en la evaluación histológica.		
Nota 2: 2 Las observaciones iniciales hechas antes de la primera aplicación del material de prueba no se incluyen en el promedio de calificaciones.		
B.3.8.2 Evaluación histológica.		
Un patólogo evaluará microscópicamente los efectos irritantes sobre el tejido oral. El patólogo puede calificar cada tejido de acuerdo con el sistema que figura en la <i>tabla B.3</i> .		
Se suman las calificaciones para la evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de prueba y la suma se divide por el número de observaciones para obtener un promedio del grupo de prueba. Repita para los grupos de control. La puntuación máxima es 16.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Un puntaje total mayor de nueve para la evaluación microscópica en la bolsa de la mejilla de control puede indicar una patología subyacente o, en un animal de control, puede indicar un trauma en la dosificación. Cualquier situación puede requerir un vuelva a probar si otros animales de prueba o control exhiben puntajes altos equivalentes.		
Reste el promedio del grupo de control del promedio del grupo de prueba para obtener el índice de irritación (véase la <i>tabla B.4</i>).		
Para las pruebas de exposición repetida, la <i>tabla B.3</i> puede necesitar ser modificada para acomodar respuestas tisulares adicionales asociadas con irritación crónica.		
B.3.9 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de las muestras de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de las muestras de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de aplicación;		
f) cómo se realizaron las lecturas del sitio;		
g) un registro de las observaciones;		
h) la evaluación histológica;		
i) evaluación de los resultados.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Tabla B.3. Sistema de clasificación para examen microscópico para reacción de tejido oral, peneal, rectal y vaginal.		
Epitelio Normal, intacto 0 Degeneración celular o aplanamiento 1 Metaplasia 2 Erosión focal 3 Erosión generalizada 4 Infiltración de leucocitos (por campo de alta potencia) Ausente 0 Mínimo (menos de 25) 1 Leve (26 a 50) 2 Moderado (51 a 100) 3 Marcado (mayor que 100) 4 Congestión vascular Ausente 0 Mínimo 1 Leve 2 Moderado 3 Marcado 4 Edema Ausente 0 Mínimo 1 Leve 2 Moderado 3 Marcado 4		
Tabla B.4. Índice de irritación.		
Nota media 0 1 a 4 5 a 8	Descripción de respuesta Ninguna Mínima Media	

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
9 a 11 Moderada 12 a 16 Severa Otros cambios adversos de los tejidos deben registrarse e incluirse en la evaluación de la respuesta. El sistema de calificación de examen microscópico que se proporciona en la <i>tabla B.3</i> se aplica a todas las pruebas enumeradas. El "índice de irritación" se desarrolló para su uso con el modelo de irritación vaginal, pero puede usarse para las otras pruebas.		
B.4 Prueba de irritación del pene.		
B.4.1 General		
La prueba de irritación del pene solo se considerará para materiales destinados al contacto con el tejido del pene y si los datos de seguridad no pueden obtenerse por otros medios.		
B.4.2 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación del tejido del pene.		
B.4.3 Exclusión de la prueba		
Cualquier material que sea irritante para la piel o los ojos o materiales con un pH $\leq 2,0$ o $\geq 11,5$ no se analizarán y se etiquetará como un irritante potencial para el pene.		
B.4.4 Muestra de prueba		
Si la muestra de prueba es sólida o líquida, se preparará como se especifica en el <i>Anexo A</i> .		
B.4.5 Animales y ganadería		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Se utilizarán conejos albinos machos o cobayos. Serán adultos jóvenes sanos, con un peso mínimo de 2 kg para conejos y de 300 a 500 g para cobayos.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en MGA-DM 10993-2.		
La longitud del pene que puede quedar expuesta debe ser de al menos 1 cm.		
Debido a la variación de pigmento individual, los animales deben ser observados y clasificados para eritema antes de la primera aplicación de prueba. El sistema que figura en la <i>tabla B.2</i> se utilizará para calificar cualquier eritema. No se utilizarán animales que muestren decoloración severa o que tengan un grado de eritema de 2 o mayor.		
Inicialmente se utilizará un mínimo de tres animales para evaluar el material de prueba, y tres animales como grupo de control.		
Si la respuesta en la prueba inicial es equívoca o no está clara, se considerarán pruebas adicionales.		
B.4.6 Procedimiento de prueba		
Coloque al animal en posición supina con las extremidades aseguradas por un asistente.		
Con el dedo índice y medio, presione suavemente el área genital para sobresalir el pene.		
Cuando sobresalga el pene, aplique suficiente (aproximadamente 0.2 mL) de la muestra de prueba para asegurarse de que el pene esté recubierto.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Permita que el pene se retraiga hacia la vaina. Tome medidas para prohibir al animal lamer el sitio de prueba y confundir la irritación primaria por factores secundarios (por ejemplo, collar isabelino).		
Alternativamente, el animal puede estar asegurado en un dispositivo de retención diseñado adecuadamente durante (1 ± 0.1) h después de la última aplicación.		
Para exposición aguda, repita el procedimiento anterior cada hora (± 0.1) h durante 4 h.		
Para las pruebas prolongadas de exposición repetida, base el número de aplicaciones, su duración y su intervalo en el tiempo de exposición previsto en la situación clínica.		
B.4.7 Observación de animales.		
Para la exposición aguda, tenga en cuenta la apariencia del pene 1 ± 0.1 h después de la aplicación inicial (por ejemplo, inmediatamente antes de la siguiente aplicación) y los tratamientos posteriores. Observe y registre la apariencia del pene a 1 ± 0.1 h, 24 ± 2 h y 48 ± 2 h después de la última aplicación.		
Para pruebas prolongadas de exposición repetida, observe la apariencia del pene a 1 ± 0.1 h después de la aplicación inicial e inmediatamente antes de la siguiente aplicación.		
Califique las reacciones de la superficie de la piel para el eritema de acuerdo con el sistema proporcionado en la <i>tabla B.2</i> para cada animal en		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
cada intervalo de tiempo y registre los resultados para el informe de la prueba.		
Si algún animal presenta enrojecimiento antes de la primera aplicación de prueba, la calificación dada antes de la primera aplicación de la muestra de prueba se resta de las calificaciones de eritema en las observaciones cronometradas para determinar el grado de eritema debido a la muestra de prueba. La calificación más alta posible para una observación es cuatro.		
B.4.8 Evaluación de resultados		
B.4.8.1 Evaluación macroscópica		
Compare el pene y la vaina tratados con el pene de los animales de control.		
Las calificaciones (véase la <i>tabla B.2</i>) para cada observación se suman y se dividen por el número de observaciones para determinar la calificación promedio por animal.		
Nota 1: estas observaciones pueden ayudar en la evaluación histológica.		
Nota 2: las observaciones iniciales hechas antes de la primera aplicación del material de prueba no se incluyen en el promedio de calificaciones.		
Inmediatamente después de la observación de 48 h, sacrifique humanamente a los animales. Diseccione el pene y la vaina distales y colóquelos en un fijador apropiado antes del procesamiento para el examen histológico.		
B.4.8.2 Evaluación histológica		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Un patólogo evaluará los efectos irritantes en la piel del pene. El patólogo puede calificar cada tejido de acuerdo con el sistema dado en la <i>tabla B.3</i> .		
Se suman las calificaciones para la evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de prueba y la suma se divide por el número de observaciones para obtener un promedio del grupo de prueba. La puntuación máxima es 16.		
Repita para los grupos de control.		
Un puntaje total mayor de nueve para la evaluación microscópica en un animal de control puede indicar un trauma en la dosificación.		
Se puede requerir una nueva prueba si otros animales de prueba o control exhiben altas calificaciones equivalentes.		
Reste el promedio del grupo de control del promedio del grupo de prueba para obtener el índice de irritación (consulte la <i>tabla B.4</i>).		
Para pruebas prolongadas de exposición repetida, la <i>tabla B.3</i> puede necesitar ser modificada para acomodar respuestas tisulares adicionales asociadas con irritación crónica.		
B.4.9 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
A. Una descripción de la muestra de prueba.		
B. La indicación de uso prevista de las muestras de prueba.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
C. Una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba.		
D. Una descripción de los animales de prueba.		
E. El método de aplicación.		
F. Cómo se realizaron las lecturas del sitio.		
G. Un registro de las observaciones.		
H. La evaluación histológica.		
I. Evaluación de los resultados.		
B.5 Prueba de irritación rectal		
B.5.1 General		
La prueba de irritación rectal solo se considerará para materiales destinados al contacto con el tejido rectal y si los datos de seguridad no pueden obtenerse por otros medios.		
B.5.2 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación del tejido rectal.		
B.5.3 Exclusión de la prueba		
Cualquier material que sea irritante para la piel o los ojos o aquellos con un $\text{pH} \leq 2.0$ o ≥ 11.5 no se analizará y se etiquetará como un irritante rectal potencial.		
B.5.4 Material de prueba		
Si el material de prueba es sólido o líquido, se preparará como se especifica en el Anexo A.		
B.5.5 Animales y cría		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Se utilizarán conejos albinos adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa, que pesen no menos de 2 kg.		
Si se utilizan otras especies, la elección estará justificada.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el MGA-DM 10993-2.		
Inicialmente se utilizará un mínimo de tres animales para evaluar el material de ensayo y tres animales como grupo de control.		
Si la respuesta en la prueba inicial es equívoca o no está clara, se considerarán pruebas adicionales.		
Se debe controlar a los animales para detectar secreción rectal, hinchazón y/u otra evidencia de infección, irritación y/o lesión en el intestino delgado antes de cada tratamiento.		
B.5.6 Procedimiento de prueba		
Conecte un catéter blando corto (6 cm) o una cánula de punta roma a una jeringa con capacidad para administrar más de 1 mL, y llene la jeringa y el catéter de modo que se dosifique 1 mL de la muestra de prueba. Prepare una jeringa separada con catéter adjunto para cada animal.		
Asegure al animal colocándolo en un dispositivo de retención que permita el acceso al perineo, o por un asistente que sujete cuidadosamente al animal y asegure las patas traseras de tal manera que exponga el perineo.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Justo antes de la inserción, humedezca el catéter con la muestra de control o con un lubricante adecuado.		
Agarre y levante la cola del animal para exponer el perineo. Inserte suavemente el catéter humedecido profundamente en el recto y deposite la dosis completa de 1 mL de la jeringa. Retirar el catéter y desechar adecuadamente.		
Debido a las diferencias en la capacidad del recto de animales individuales, parte de la muestra de prueba puede ser descargada durante o inmediatamente después de ser depositada. Retire suavemente cualquier material expulsado con un tejido blando.		
Repita el procedimiento anterior a intervalos de 24 $\pm$ 2 h todos los días durante cinco días consecutivos.		
Para las pruebas prolongadas de exposición repetida, base el número de aplicaciones, su duración y su intervalo en el tiempo de exposición previsto en la situación clínica.		
B.5.7 Observación de animales.		
A las 24 $\pm$ 2 h después de la aplicación inicial e inmediatamente antes de cada tratamiento, observe y registre la aparición del perineo para detectar signos de secreción, eritema e irritación.		
Los animales que exhiben secreción excesiva, hinchazón y/o que son difíciles de dosificar deben ser sacrificados humanamente y los tejidos examinados (Véanse los puntos B.5.8.1 y B.5.8.2).		
B.5.8 Evaluación de resultados		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
B.5.8.1 Evaluación macroscópica		
A las 24 ± 2 h después de la última dosis, mata humanamente a los animales. Diseccionar, liberar todo el intestino inferior, abrir longitudinalmente y examinar en busca de signos de irritación, lesión de la capa epitelial de tejido y necrosis.		
Coloque el recto y la porción distal del intestino grueso en un fijador apropiado antes del procesamiento para el examen histológico.		
Compare los tejidos rectales de los conejos de prueba con el tejido rectal de los conejos de control.		
Registre y describa la apariencia macroscópica del tejido rectal para cada animal, observando las diferencias entre los sitios de prueba y control.		
Nota: Estas observaciones pueden ayudar en la evaluación histológica.		
B.5.8.2 Evaluación histológica		
Un patólogo evaluará los efectos irritantes sobre el tejido rectal. El patólogo puede calificar cada tejido de acuerdo con el sistema que figura en la <i>tabla B.3</i> .		
Agregue las calificaciones para la evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de prueba y divida la suma por el número de observaciones para obtener un promedio del grupo de prueba. La puntuación máxima es 16.		
Repita para los grupos de control.		
Un puntaje total mayor de nueve para la evaluación microscópica en un animal de control		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
puede indicar un trauma en la dosificación. Se puede requerir una nueva prueba si otros animales de prueba o control exhiben puntajes altos equivalentes.		
Reste el promedio del grupo de control del promedio del grupo de prueba para obtener el índice de irritación (véase la <i>tabla B.4</i>).		
Para pruebas prolongadas de exposición repetida, la <i>tabla B.3</i> puede necesitar ser modificada para acomodar respuestas tisulares adicionales asociadas con irritación crónica.		
B.5.9 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de las muestras de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de las muestras de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de aplicación;		
f) cómo se realizaron las lecturas del sitio;		
g) un registro de las observaciones;		
h) la evaluación histológica;		
i) evaluación de los resultados.		
B.6 Prueba de irritación vaginal.		
B.6.1 General		
La prueba de irritación vaginal solo se considerará para materiales destinados al contacto con el		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
tejido vaginal y si los datos de seguridad no pueden obtenerse por otros medios.		
B.6.2 Principio		
Se realiza una evaluación del potencial del material bajo prueba para producir irritación del tejido vaginal.		
B.6.3 Exclusión de la prueba		
Cualquier material que sea irritante para la piel o los ojos o materiales con un pH ≤ 2.0 o ≥ 11.5 no se analizarán y se etiquetará como un irritante vaginal potencial.		
B.6.4 Material de prueba		
Si el material de prueba es sólido o líquido, se preparará como se especifica en el Anexo A.		
B.6.5 Animales y cría		
Se utilizarán conejos albinos hembra jóvenes adultos sanos de una sola cepa que pesen no menos de 2 kg. Si se utilizan otras especies, la elección estará justificada.		
Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica en el MGA-DM 10993-2.		
Inicialmente se utilizará un mínimo de tres animales para evaluar el material de prueba, y tres animales como grupo de control.		
Si la respuesta en la prueba inicial es equívoca o no está clara, se considerarán pruebas adicionales.		
Los animales deben ser controlados por flujo vaginal, hinchazón y / u otra evidencia de infección vaginal, irritación y / o lesión antes de cada		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
tratamiento. También se debe realizar una verificación en la etapa del ciclo del celo para garantizar que no se dé una reacción falsa positiva en función de los cambios fisiológicos en la vagina.		
B.6.6 Procedimiento de prueba		
Conecte un catéter blando corto (6 cm) o una cánula de punta roma a una jeringa con capacidad para administrar más de 1 mL, y llene la jeringa y el catéter de modo que se dosifique 1 mL de la muestra de prueba. Prepare una jeringa separada con catéter adjunto para cada animal.		
Asegure al animal colocándolo en un dispositivo de retención que permita el acceso a la vagina o por un asistente que sujete cuidadosamente al animal y asegure las patas traseras de tal manera que exponga la vagina.		
Humedezca el catéter en la muestra de control o en un lubricante adecuado.		
Agarre y levante la cola del animal para exponer la abertura vaginal. Inserte suavemente el catéter humedecido profundamente en la vagina y deposite la dosis completa de 1 mL de la jeringa. Retire el catéter y deséchelo adecuadamente.		
Debido a las diferencias en la capacidad de la vagina de animales individuales, parte de la muestra de prueba puede ser descargada durante o inmediatamente después de ser depositada. Retire suavemente cualquier material expulsado con un tejido blando.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Repita el procedimiento anterior a intervalos de 24 ± 2 h todos los días durante un mínimo de cinco días consecutivos.		
Para las pruebas prolongadas de exposición repetida, base el número de aplicaciones, su duración y su intervalo en el tiempo de exposición previsto en la situación clínica.		
B.6.7 Observación de animales.		
A las 24 ± 2 h después de la aplicación inicial e inmediatamente antes de cada tratamiento, observe y registre la aparición de la abertura vaginal y el perineo en busca de signos de secreción, eritema y edema.		
Los animales que exhiben secreción excesiva, eritema y / o edema, y que son difíciles de dosificar, deben ser sacrificados humanamente y los tejidos examinados (véanse los puntos B.6.8.1 y B.6.8.2).		
B.6.8 Evaluación de resultados		
B.6.8.1 Evaluación macroscópica		
A las 24 ± 2 h después de la última dosis, mata humanamente a los animales. Diseccione la vagina entera, ábrala longitudinalmente y examine en busca de signos de irritación, lesión de la capa epitelial de tejido y necrosis.		
Coloque la vagina en un fijador apropiado antes del procesamiento para el examen histológico. Se tomarán tres secciones, para incluir las porciones cervical, central y caudal de cada vagina.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Compare las vaginas de los animales tratados con el material de prueba con las vaginas de los animales de control.		
Registre y describa la apariencia macroscópica del tejido vaginal para cada animal, observando las diferencias entre los grupos de prueba y control.		
Nota: Estas observaciones pueden ayudar en la evaluación histológica.		
B.6.8.2 Evaluación histológica		
Un patólogo evaluará los efectos irritantes sobre el tejido vaginal. El patólogo puede calificar cada tejido de acuerdo con el sistema dado en la <i>tabla B.3</i> .		
Se suman las calificaciones para la evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de prueba y la suma se divide por el número de observaciones para obtener un promedio del grupo de prueba. La puntuación máxima es 16.		
Repita para los grupos de control.		
Un puntaje total mayor de nueve para la evaluación microscópica en un animal de control puede indicar un trauma en la dosificación y puede requerir una nueva prueba si otros animales de prueba o control exhiben puntajes altos similares.		
Reste el promedio del grupo de control del promedio del grupo de prueba para obtener el índice de irritación (consulte la <i>tabla B.4</i>).		
Para pruebas prolongadas de exposición repetida, la <i>tabla B.3</i> puede necesitar ser modificada para acomodar respuestas tisulares adicionales asociadas con irritación crónica.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
B.6.9 Informe de prueba		
El informe de prueba incluirá:		
a) una descripción de las muestras de prueba;		
b) el uso / aplicación prevista de las muestras de prueba;		
c) una descripción detallada del método empleado en la preparación de las muestras de prueba;		
d) una descripción de los animales de prueba;		
e) el método de aplicación;		
f) cómo se realizaron las lecturas del sitio;		
g) un registro de las observaciones;		
h) la evaluación histológica;		
i) evaluación de los resultados.		
ANEXO C		
PRUEBA DE IRRITACIÓN DE LA PIEL HUMANA		
C.1 General		
Los siguientes requisitos se aplican además de las normas ISO 14155-1 e ISO 14155-2 en la medida en que son más específicos.		
C.2 Principio		
Una sola dosis del material a analizar se aplica bajo oclusión a la piel de voluntarios humanos. La irritación se mantiene al mínimo aplicando el material de prueba por períodos cortos. Los períodos de exposición más largos también pueden ser apropiados bajo ciertas circunstancias.		
El principal medio de evaluación es determinar la proporción de voluntarios humanos que		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
desarrollan irritación de la piel en relación con una reacción a un material de control positivo concurrente.		
C.3 Descripción del método.		
C.3.1 Selección de voluntarios humanos		
Este MGA-DM está diseñada para su uso con voluntarios humanos sanos. Los voluntarios humanos seleccionados deberán tener al menos 18 años de edad, no estar embarazadas ni en periodo de lactancia. Además, los voluntarios humanos con una sensibilidad conocida al material de prueba o que muestren signos de dermatitis serán excluidos de la prueba. La selección de voluntarios será supervisada por un dermatólogo u otra persona calificada.		
C.3.2 Preparación de dosis		
Los materiales de prueba líquidos generalmente se usan sin diluir. Al probar sólidos, humedezca el material de prueba con una pequeña cantidad de agua (típicamente 0,2 ml) o, cuando sea necesario, con otro vehículo adecuado para asegurar un buen contacto con la piel. Se debe tener en cuenta la estructura del sólido y se debe justificar la elección de la preparación del material de prueba. Cuando utilice muestras humedecidas, asegúrese de que cada sujeto reciba la misma cantidad de material de prueba. Use la misma cantidad de agua para humedecer a cada individuo en la prueba y registre esta cantidad.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Cuando se utilizan vehículos, se debe tener en cuenta la influencia del vehículo sobre la irritación de la piel por el material de prueba. Si se usa un vehículo que no sea agua como agente humectante para compuestos sólidos, considere la aplicación de un parche de líquido en blanco (blanco) en cada sujeto.		
C.3.3 Procedimiento		
C.3.3.1 Número de voluntarios.		
Al menos 30 voluntarios completarán la prueba, con no menos de un tercio de cada sexo.		
C.3.3.2 Aplicación del material de prueba.		
Aplique el material de prueba a la piel intacta en un sitio adecuado, por ejemplo, el brazo externo superior, por medio de una cámara oclusiva que contiene una gasa. El sitio de aplicación será el mismo para todos los voluntarios y se registrará. En general, el parche debe medir al menos 1.8 cm, preferiblemente 2.5 cm de diámetro. El parche se mantendrá en contacto con la piel mediante un apósito no irritante adecuado, incluida una cinta no irritante, durante el período de exposición.		
El parche debe administrar una dosis adecuada por unidad de área: aproximadamente 50 mg a 100 mg de material de prueba por centímetro cuadrado se considera óptimo. Cuando se aplican materiales de prueba líquidos, en general, se agregan de 0.2 ml a 0.4 mL a la gasa hasta que se humedece. Cuando se prueban materiales sólidos, en general se humedecen 0.2 g del material de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
prueba y se agregan a la gasa. Como un método alternativo de aplicación para sólidos, la gasa se humedece y el material de prueba cubre todo el sitio de prueba.		
C.3.3.3 Duración de la exposición		
Para evitar reacciones inaceptablemente fuertes, se adoptará un enfoque cauteloso para las pruebas. Un procedimiento de parche secuencial permite el desarrollo de una respuesta irritante positiva, pero no severa. Los parches se aplican progresivamente comenzando con duraciones de 15 min y 30 min, y hasta 1 h, 2 h, 3 h y 4 h. Los períodos de exposición de 15 min y / o 30 min pueden omitirse si hay suficientes indicios de que no ocurrirán reacciones excesivas después de la exposición de 1 h. La progresión a exposiciones más largas, incluida la exposición a parches cerrados de 24 h en un nuevo sitio de la piel, dependerá de la ausencia de irritación de la piel (evaluada hasta al menos 48 h) que surja de las exposiciones más cortas, para garantizar que cualquier reacción irritante retrasada se evalúa adecuadamente.		
La aplicación del material durante un período de exposición más largo siempre se realiza en un sitio no tratado previamente.		
Al final del período de exposición, el material de prueba residual se eliminará, cuando sea posible, utilizando agua o un solvente apropiado, sin alterar		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
la respuesta existente o la integridad de la epidermis.		
C.3.3.4 Exposición limitada		
Además del aumento gradual en la duración de la aplicación como se describe en C.3.3.3, si se sospecha que el material puede producir irritación severa, se empleará un tiempo de exposición sustancialmente reducido, posiblemente en un grupo piloto de voluntarios. El progreso del estudio se puede definir sobre la base de los datos producidos.		
Los parches posteriores solo se aplican después de las lecturas 48 ± 2 h y 72 ± 2 h.		
C.3.3.5 Observación clínica y clasificación de las reacciones cutáneas.		
Los sitios de tratamiento se examinan para detectar signos de irritación y las respuestas se puntúan inmediatamente después de la extracción del parche y de 1 ± 0.1 h a 2 ± 1 h, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la eliminación del parche. Si es necesario para determinar la reversibilidad de la respuesta, el período de observación puede extenderse más allá de las 72 h. Además, la condición de la piel antes y después de la prueba debe describirse a fondo (por ejemplo, pigmentación y grado de hidratación). La irritación de la piel se clasifica y registra de acuerdo con la clasificación dada en la <i>tabla C.1</i> .		
Se pueden aplicar métodos de bioingeniería no invasivos (véase el <i>Anexo E</i>).		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<i>Tabla C.1. Prueba de irritación de la piel humana, escala de clasificación.</i>		
Descripción de la respuesta	Clasificación	
Sin reacción	0	
Reacción débilmente positiva (generalmente caracterizada por leve eritema y / o sequedad en la mayor parte del sitio de tratamiento)	1	
Reacción moderadamente positiva (generalmente eritema distinto o sequedad, posiblemente extendiéndose más allá del sitio de tratamiento)	2	
Reacción fuertemente positiva (fuerte y a menudo se extiende eritema con edema y / o formación de escamas)	3	
Para los voluntarios que tienen una calificación de 1 o más después de una exposición de menos de 4 h, se supone que presentarán una reacción más fuerte si se exponen al material durante 4 h. Una vez que se ha obtenido una calificación de 1 o mayor, no hay necesidad de someter al voluntario que reacciona a un tratamiento adicional con el material. Se pueden requerir observaciones adicionales para una adecuada atención voluntaria. Además de la observación de la irritación, cualquier otro efecto debe registrarse y describirse completamente. Por ejemplo, los voluntarios deben estar capacitados para hacer comentarios relacionados con las aplicaciones del parche (por ejemplo, los efectos sensoriales), y los evaluadores deben estar capacitados para observar las respuestas inmediatas (por ejemplo, la urticaria) cuando se quitan los parches. Dichas observaciones no indican necesariamente un		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
efecto irritante, pero se incluirán en el informe de prueba si se indica. Si es significativo, se considerarán en la gestión del estudio para garantizar la atención adecuada de los voluntarios.		
Los datos críticos obtenidos son el número de voluntarios que tuvieron, o se esperaría que tengan, irritación de la piel después de una exposición de hasta 4 h. El tiempo requerido para que una persona desarrolle una respuesta (si la hay) no forma parte de los resultados a evaluar; se relaciona solo con garantizar el cuidado adecuado de los voluntarios.		
C.3.3.6 Justificación y selección de una sustancia de control positivo concurrente		
Como los humanos muestran variaciones en sus respuestas a los irritantes, se debe incluir un control positivo para determinar la idoneidad de un panel de prueba para detectar los efectos irritantes del compuesto de prueba. Preferiblemente, se utilizará dodecilsulfato de sodio al 20 % como control positivo ya que sus efectos irritantes están bien caracterizados (véase el <i>punto F.1</i>). Se pueden usar otros controles si están justificados.		
Se puede incluir un control positivo de rutina como punto de referencia. La irritación de la piel no es un fenómeno absoluto. Todos los materiales pueden provocar irritación de la piel; Es simplemente una cuestión de dosis y la naturaleza y el alcance de la exposición.		
Por lo tanto, las pruebas de irritación de la piel en humanos son casi siempre comparativas y deben		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
estar relacionadas con la irritación química conocida.		
C.4 Datos e informes		
C.4.1 Datos		
Los datos, incluidos los resultados con materiales de control positivo y negativo, se resumirán en forma tabular, mostrando para cada individuo la clasificación de irritación a las (24 ± 2) h, (48 ± 2) h y (72 ± 2) h después de la extracción del parche y cualquier otro efecto observado		
C.4.2 Evaluación / interpretación de datos		
El objetivo de esta prueba es determinar si un material presenta un riesgo potencial de irritación cutánea significativo después de una exposición aguda. Por lo tanto, si el material produce una frecuencia de irritación de la piel en los sujetos de prueba que es similar o mayor que el control positivo, se considerará un irritante importante de la piel. Por otro lado, si produce una frecuencia de irritación de la piel en los sujetos de prueba que es sustancial y significativamente menor que el control positivo, entonces no se considerará como un irritante importante de la piel. Es importante que los datos provisionales generados en el contexto del cuidado voluntario no se confundan con los datos finales, es decir, la proporción de los sujetos que exhiben una reacción irritante. También es importante no confundir la variación individual en la susceptibilidad a la irritación de la		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
piel con el problema del potencial de irritación general de la piel del material de prueba.		
C.4.3 Informe de prueba		
Para el informe de prueba, se deben seguir los requisitos de las normas ISO 14155-1 e ISO 14155-2. Para informes específicos sobre la prueba de irritación de la piel humana, también se incluirá la siguiente información:		
A. Consideraciones éticas y confirmación del consentimiento de los voluntarios;		
B. Material de prueba:		
1) naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;		
2) datos de identificación;		
C. Vehículo:		
1) identificación y justificación de la elección del vehículo utilizado para humedecer un material de prueba sólido;		
d) voluntarios:		
1) número de voluntarios que fueron tratados con el material de prueba;		
2) distribución por edad / sexo de los voluntarios;		
e) resultados:		
1) tasa de respuesta a 0 h, 1 ± 0.1 h a 2 ± 0.2 h, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h y en cualesquiera otros tiempos anotados;		
2) tabulación de los datos de reacción de irritación para cada individuo para cada periodo de tiempo de observación (con frecuencia resumida de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
velocidad de reacción irritante, por ejemplo, 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h después de la eliminación del parche);		
3) descripción de todas las reacciones irritantes observadas;		
4) descripción de cualquier otro efecto además de la irritación observada;		
5) tratamiento estadístico de los resultados (comparación con control positivo, por ejemplo, utilizando la prueba exacta de Fisher);		
6) descripción o referencia de una prueba en animales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> , si se realiza una antes de la prueba en voluntarios humanos, incluidos los detalles del procedimiento y los resultados obtenidos con la prueba y los materiales de referencia;		
f) discusión de los resultados.		
ANEXO D		
PRUEBAS <i>IN VITRO</i> PARA IRRITACIÓN DE LA PIEL.		
D.1 Información de antecedentes		
Recientemente, se han publicado varios estudios sobre la evaluación y validación de ensayos <i>in vitro</i> para la determinación de la actividad irritante de productos químicos como una alternativa para la prueba de irritación de la piel del conejo. Véanse las referencias [101] [102] [103] [104]. En 2007, el Comité Asesor Científico de ECVAM (ESAC) evaluó el proceso de validación de un modelo de piel humana <i>in vitro</i> para la		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
determinación de la irritación cutánea de productos químicos. Véase la referencia [101]. Después de esta evaluación, ESAC aprobó lo siguiente.		
"Después de una revisión de informes científicos y publicaciones revisadas por pares sobre el siguiente rango de pruebas <i>in vitro</i> , que habían sido sometidas a un estudio de validación completo:		
1. EpiDermTM (con reducción de MTT y liberación de IL-1α)		
2. EPISKINTM (con reducción de MTT y liberación de IL-1α)		
El método EPISKINTM mostró evidencia de ser una prueba independiente confiable y relevante para predecir la irritación de la piel del conejo, cuando el punto final se evalúa mediante la reducción de MTT, y para ser utilizado como un reemplazo (basado en el desempeño del ensayo como se especifica en el Anexo) para la prueba Draize de irritación de la piel (OCDE TG 404 y Método B.4 del Anexo V de la Directiva 67/548 / CEE) a los efectos de distinguir entre las sustancias de prueba R38 irritantes de la piel y sin etiqueta (no irritantes de la piel). En la actualidad, el punto final de IL-1α debe considerarse como un complemento útil para el ensayo MTT, ya que tiene el potencial para aumentar la sensibilidad de la prueba, sin reducir su especificidad. Este punto final podría usarse para confirmar los negativos obtenidos con el punto final MTT.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
En este momento, debido a su alta especificidad, el modelo EpiDermTM identifica de manera confiable los irritantes de la piel, pero los resultados negativos pueden requerir más pruebas p.ej. de acuerdo con la estrategia escalonada, como se describe en la <i>referencia</i> [7]).		
Se debe mejorar el protocolo EpiDermTM para aumentar el nivel de sensibilidad".		
Los modelos EPISKINTM y EpiDermTM identifican de manera confiable los químicos irritantes de la piel, mientras que solo el modelo EPISKINTM puede usarse para demostrar propiedades no irritantes (sin etiqueta) de los químicos. En el modelo EPISKINTM, se puede usar la determinación de la producción de IL-1 α o confirmación adicional de respuestas negativas. Una respuesta negativa en el modelo EpiDermTM necesita confirmación en la prueba de irritación de la piel del conejo.		
Además de los modelos de máscaras disponibles comercialmente (véase también el <i>punto D.2.2</i>), también están disponibles los modelos de "código abierto"; estos se basan en el mismo principio de usar células humanas en una matriz equivalente de piel. Véase la <i>referencia</i> [109].		
D.2 Principio de las pruebas de irritación cutánea <i>in vitro</i>.		
D.2.1 General		
El principio del ensayo de irritación del modelo de piel <i>in vitro</i> se basa en la premisa de que los		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
químicos irritantes pueden penetrar el estrato córneo por difusión y son citotóxicos para las células en las capas subyacentes. Además, si el efecto citotóxico está ausente o es débil, el número libera un número cuantificable de mediadores inflamatorios epidermis y puede usarse en un enfoque escalonado para aumentar la sensibilidad de la prueba.		
El material de prueba se aplica tópicamente a un modelo epidérmico humano tridimensional, compuesto por al menos una epidermis reconstruida con varias capas de células epidérmicas y un estrato córneo funcional.		
Los materiales irritantes se identifican por su capacidad para disminuir la viabilidad celular por debajo de los niveles umbral definidos (por ejemplo, 50 %). Como medida adicional de irritación de la piel, se puede determinar la liberación de mediadores inflamatorios (por ejemplo, interleucina 1α).		
En los estudios de validación, se incluyeron productos químicos cuidadosamente seleccionados que representan un amplio espectro de clases químicas para la validación del sistema de prueba de modelo de piel humana <i>in vitro</i> para la irritación de la piel. Véanse las referencias [102] [103] [104]. Se espera que el método sea generalmente aplicable en todas las clases químicas, excepto para gases y aerosoles.		
D.2.2 Características generales del modelo		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Los modelos de piel humana se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, EpiDermTM, EPISKINTM, Vitrolife-Skin, TESTSKIN, Labcyte EPI-MODEL) o se pueden desarrollar o construir en el laboratorio de pruebas. Cualquier modelo nuevo debe validarse y compararse con los modelos existentes. Los queratinocitos humanos deben usarse para construir el epitelio. Deben estar presentes múltiples capas de células epiteliales viables (capa basal, estrato espinoso, estrato granuloso) debajo de un estrato córneo funcional. El estrato córneo debe tener varias capas que contengan el perfil lipídico esencial para producir una barrera funcional con robustez para resistir la rápida penetración de los marcadores químicos citotóxicos, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio o Triton X-100. Esta propiedad puede estimarse mediante la determinación de IC50 o ET50 después de la aplicación de un químico marcador citotóxico establecido. Las propiedades de contención del modelo deberían evitar el paso de material alrededor del estrato córneo al tejido viable, lo que conduciría a un modelado deficiente de la exposición a la piel.		
Para la caracterización general de un nuevo modelo epidérmico o de piel, se debe realizar una evaluación histológica (tinción H&E), identificación de las queratinas (histoquímica inmune) y perfil de lípidos [cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC)]. Véase la referencia [110].		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
El modelo de piel no debe estar contaminado por bacterias, micoplasmas u hongos.		
D.2.3 Requisitos del modelo funcional.		
D.2.3.1 General		
Las condiciones del modelo funcional se describen en la Referencia [105]. Los siguientes criterios son aplicables al uso de la prueba de irritación cutánea <i>in vitro</i> .		
D.2.3.2 Viabilidad		
La magnitud de la viabilidad generalmente se cuantifica utilizando MTT u otros colorantes vitales convertidos metabólicamente. En estos casos, la densidad óptica (DO) del colorante extraído (solubilizado) del tejido de control negativo debe ser al menos 20 veces mayor que la DO del disolvente de extracción solo. La DO de los tejidos de control negativo debe estar preferiblemente por encima de 0.8. Debe documentarse que el tejido de control negativo es estable en cultivo durante la duración de la prueba. Esto puede hacerse realizando el ensayo de viabilidad en varios puntos de tiempo durante el periodo de prueba. Las mediciones deben proporcionar una viabilidad similar para cada punto de tiempo.		
D.2.3.3 Función de barrera		
El estrato córneo (SC) y su composición lipídica deberían ser suficientes para resistir la rápida penetración de los marcadores químicos citotóxicos, p. dodecilsulfato de sodio o Triton X-		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
100. Esta propiedad puede estimarse mediante la determinación de la concentración a la que un marcador químico reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (IC50) después de un tiempo de exposición fijo, o mediante la determinación del tiempo de exposición requerido para reducir la viabilidad celular en un 50 % (ET50) tras la aplicación del marcador químico a una concentración fija específica. El ET50 de un SC suficientemente funcional debe estar por encima de 2 h.		
D.2.3.4 Morfología		
Se debe realizar un examen histológico continuo de la piel / epidermis reconstruida, que muestre una estructura similar a la piel / epidermis humana (incluida la SC funcional). El fabricante de la construcción de la piel puede proporcionar esta información.		
D.2.3.5 Reproducibilidad		
Los resultados del método que utiliza un modelo específico deben demostrar la reproducibilidad en el tiempo. El modelo debe ser capaz de demostrar la predicción correcta de los productos químicos de referencia durante un período de tiempo prolongado (véase la <i>tabla D.1</i>).		
<i>Tabla D.1.</i> Ejemplos de criterios de liberación de lotes de control de calidad.		
Límite inferior aceptable Promedio del rango aceptable		

"2021, Año de la Independencia"

Dice			Debe decir	Justificación*
EPISKIN™ (18 h SLS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml	
EpiDerm™ (1 % Triton X100)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 6,7 h	ET ₅₀ = 8,7h	
D.2.3.6 Controles de calidad (QC) del modelo. Cada lote del modelo epidérmico utilizado deberá cumplir con criterios definidos de liberación de producción, entre los cuales los más relevantes son la viabilidad y la función de barrera. El proveedor del modelo de piel (o el investigador cuando utilice un modelo interno) establecerá un rango de aceptabilidad (límite superior e inferior) para el IC50 o el ET50. Solo los resultados producidos con tejidos calificados pueden aceptarse para una predicción confiable de los efectos de irritación. Como ejemplo, los rangos de aceptabilidad para EPISKINTM y EpiDermTM se dan en D.3. D.3 Material de prueba El material de prueba puede estar compuesto de sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Los sólidos deben triturarse en polvo antes de la aplicación; No se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. Para dispositivos médicos o extractos de biomateriales, se pueden utilizar disolventes polares y no polares. Un control de referencia negativo y un control de referencia positivo deben probarse simultáneamente con las sustancias de prueba				

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
para demostrar que la viabilidad (control de referencia negativo), la función de barrera y la sensibilidad resultante del tejido (control de referencia positivo) de los tejidos están dentro de un rango de aceptación histórico definido. Para obtener una lista de sustancias de control positivo, consulte la <i>referencia</i> [105]. Un control negativo no irritante (NC) (p. Ej., PBS, agua o blanco) se probará simultáneamente con la sustancia de prueba. Los tejidos de control negativo deben ser estables en cultivo y proporcionar mediciones de viabilidad similares a lo largo de la exposición química de prueba y los períodos posteriores a la incubación. Se establecerá una viabilidad mínima (por ejemplo, expresada como OD absoluta del tinte vital) como criterio de aceptación de la prueba. En general, dicho control negativo debería tener un OD superior a 0.8. Se debe usar un control positivo (PC) apropiado en el ensayo (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio al 5 %) para evitar la "eliminación" completa del modelo. El rango de respuestas a la PC se desarrollará y se basará en los datos obtenidos en un número suficiente de experimentos independientes. En cada ensayo, el control positivo se clasificará correctamente como irritante, estará dentro del rango establecido de respuestas y la desviación estándar de las tres réplicas de tejido estará por debajo de un máximo definido. Si no se cumplen estos criterios, el ensayo se declara no válido y debe repetirse. Los rangos típicos para dos		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*									
modelos de piel utilizados en el estudio de validación de irritación cutánea ECVAM (EPISKINTM y EpiDermTM) se muestran en la <i>tabla D.2.</i> <i>Tabla D.2. Ejemplo para el rango de respuestas del modelo a un control positivo (dodecilsulfato de sodio al 5 %)</i>											
<table> <tr> <th>Piel Modelo</th><th>Viabilidad</th><th>Rango</th></tr> <tr> <td>EPISKINTM</td><td><40 %</td><td>1.5 a 32.2 (1.3 a 41.6)^a</td></tr> <tr> <td>EpiDermTM</td><td><20 %</td><td>3.7 a 13.8 (4.7 a 13.6)^a</td></tr> </table> ^a 95 % intervalo de confianza	Piel Modelo	Viabilidad	Rango	EPISKINTM	<40 %	1.5 a 32.2 (1.3 a 41.6) ^a	EpiDermTM	<20 %	3.7 a 13.8 (4.7 a 13.6) ^a	Desviación Estándar ≤18% ≤18%	
Piel Modelo	Viabilidad	Rango									
EPISKINTM	<40 %	1.5 a 32.2 (1.3 a 41.6) ^a									
EpiDermTM	<20 %	3.7 a 13.8 (4.7 a 13.6) ^a									
D.4 Procedimientos de prueba											
Las construcciones de tejido se cultivan en medio de cultivo de tejido de acuerdo con protocolos proporcionados por el fabricante. Si los tejidos han sido transportados, se debe tener cuidado de aplicar los procedimientos recomendados para el acondicionamiento antes del uso de los tejidos en el laboratorio.											
Se deben incubar al menos tres réplicas de tejido de tamaño suficiente (al menos 10 mm de diámetro, 0.63 cm ²) con las muestras de prueba y los controles. Las muestras de prueba y los controles deben incubarse con las construcciones de piel durante al menos 15 ± 5 min.											
Se debe aplicar una cantidad suficiente de sustancia de prueba para cubrir uniformemente la superficie de la piel. Se debe utilizar un mínimo de 25µL/cm ² o 25 mg/cm ² . Las sustancias sólidas											

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
deben humedecerse con agua desionizada o destilada después de la aplicación para garantizar un buen contacto con la piel. Si es apropiado, los sólidos se deben moler en polvo antes de la aplicación.		
Después de 15 ± 5 min de incubación, las muestras de prueba se retiran lavando y enjuagando con un tampón apropiado o NaCl al 0.9 %. El procedimiento de lavado y enjuague debe ser adecuado para eliminar todos los materiales de prueba. Los tejidos se incuban adicionalmente en medio fresco durante 2 ± 2 h como un período de recuperación posterior a la exposición que permite la recuperación de los efectos débilmente irritantes. Después de 42 ± 2 h, se determina la supervivencia celular.		
Nota: Es importante darse cuenta de que los extractos de dispositivos médicos pueden contener bajas concentraciones de químicos irritantes.		
Por lo tanto, puede ser necesario adaptar el período de exposición.		
Solo se pueden utilizar métodos cuantitativos para medir la viabilidad celular. Además, la medida de viabilidad debe ser compatible con el uso en una construcción de tejido tridimensional. La unión de colorantes no específicos no debe interferir con la medición de viabilidad. Por lo tanto, los colorantes de unión a proteínas y aquellos que no experimentan conversión metabólica (por ejemplo, rojo neutro) no son apropiados.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
El ensayo más utilizado es MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-1) -2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; CAS número 298-93-1)] reducción, que ha demostrado dar resultados precisos y reproducibles. La muestra de piel se coloca en una solución MTT de concentración adecuada (por ejemplo, 0.3 mg/mL a 1 mg/mL) durante 3 h. El producto de formazán azul precipitado se extrae luego usando un disolvente (isopropanol), y la concentración de formazán se mide determinando la DO a una longitud de onda entre 540 y 595 nm.		
Nota 1: la interacción química del material de prueba con el colorante vital puede imitar la del metabolismo celular, lo que lleva a una falsa estimación de la viabilidad. Esto puede ocurrir cuando un material de prueba no se elimina completamente de la piel mediante enjuague. Si el material de prueba actúa directamente sobre el tinte vital, se deben usar controles adicionales para detectar y corregir la interferencia de la sustancia de prueba con la medición de viabilidad.		
Nota 2: existen otras variantes del uso de sales de tetrazolio para la detección del metabolismo celular como medida de la viabilidad celular, como XTT, MTS y WST-1.		
Además de la supervivencia celular en las construcciones de la piel, la interleucina 1 α se puede determinar como un punto final complementario, especialmente en el modelo EPISKINTM. Para los tejidos de epidermis que muestran una viabilidad celular > 50 %, la cantidad		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
de IL-1 α liberada en el medio de cultivo de tejidos al final del período posterior a la incubación (después 42 $\pm$ 2 h después de la incubación) se mide en el medio (inmediatamente o congelado) usando un kit ELISA disponible comercialmente, Véase la Referencia [107]. La cantidad de IL-1 α debe expresarse en unidades internacionales.		
D.5 Resultados e interpretación		
Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos con cada muestra de prueba se pueden usar para calcular el porcentaje de viabilidad en comparación con el control negativo, que se establece en 100 %. El valor de corte del porcentaje de viabilidad celular que distingue los materiales de prueba irritantes de los no irritantes y el (los) procedimiento(s) estadístico(s) utilizado(s) para evaluar los resultados e identificar los materiales irritantes debe estar claramente definido y documentado, y debe probarse que es apropiado.		
La sustancia de prueba se considera irritante para la piel si en el modelo EPISKINTM o EpiDermTM la viabilidad del tejido después de la exposición y después de la incubación es del 50 %.		
Aunque IL-1 α podría ser útil para adquirir información adicional sobre el potencial irritante de los productos químicos, actualmente solo se utilizan los resultados del ensayo MTT para considerar irritante una muestra de prueba. Se están realizando investigaciones adicionales para mejorar la reproducibilidad del ensayo IL-1 α para		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
permitir la combinación de dos puntos finales para una predicción confiable de la irritación.		
En el modelo EPISKINTM para tejidos que muestran una viabilidad celular > 50 %, la cantidad de IL-1 α liberada en el medio de cultivo de tejidos al final del período posterior a la incubación [después 42 $\pm$ 2 h después de la incubación] se mide en el medio (inmediatamente o congelado).		
La sustancia de prueba se considera irritante para la piel si la viabilidad después de 15 $\pm$ 5 min de exposición y 42 $\pm$ 2 h después de la incubación es superior al 50 %, y la cantidad de liberación de IL-1 α es superior a 9 UI/mL.		
La sustancia de prueba se considera no irritante para la piel si la viabilidad después de 15 $\pm$ 5 min de exposición y 42 $\pm$ 2 h después de la incubación es superior al 50 %, y la cantidad de liberación de IL-1 α es u 9 UI/mL.		
En el modelo EpiDermTM, una respuesta negativa necesita confirmación en la prueba de irritación de la piel del conejo.		
D.6 Informe de prueba		
El informe de prueba debe incluir la siguiente información:		
a) justificación del modelo de piel y protocolo utilizado;		
b) descripción de las muestras de prueba y muestras de control, incluidos los nombres químicos, como el nombre IUPAC o CAS y el número CAS, si se conocen;		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
c) pureza y composición de la sustancia o preparación [en porcentaje (s) en peso];		
d) propiedades físico-químicas tales como estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, solubilidad en agua relevantes para la realización del estudio;		
e) tratamiento de las sustancias de prueba / control antes de la prueba, si corresponde (por ejemplo, calentamiento, molienda);		
f) estabilidad, si se conoce;		
g) sistema celular utilizado;		
h) información de calibración para el equipo utilizado para el dispositivo de medición utilizado para medir la viabilidad celular (por ejemplo, espectrofotómetro);		
i) información de soporte completa para el modelo de piel específico utilizado, incluida su validez;		
j) detalles del procedimiento de prueba utilizado;		
k) dosis de prueba utilizadas;		
l) descripción de cualquier modificación del procedimiento de prueba;		
m) referencia a datos históricos del modelo;		
n) descripción de los criterios de evaluación utilizados;		
o) evaluación de resultados, incluida la tabulación de datos de muestras de prueba individuales y la validez de los controles de ensayo;		
p) descripción de otros efectos observados;		
q) discusión de los resultados;		
r) conclusiones.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
ANEXO E		
MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE MATERIALES DE PRUEBA POLIMÉRICOS.		
E.1 General		
Este anexo proporciona orientación sobre la preparación de extractos de un material de prueba polimérico para ser utilizado en la prueba de sensibilización de maximización en cobayo (GPMT). La preparación del extracto se describe originalmente en la <i>referencia</i> [22].		
E.2 Método de preparación		
E.2.1 Extracción preliminar		
Se realiza un procedimiento de extracción preliminar en la muestra de prueba para determinar el proceso de extracción más adecuado para su uso en el GPMT.		
El metanol y la acetona son los solventes recomendados para la extracción. La muestra de prueba se corta en trozos pequeños (si es posible) y se coloca en dos matraces separados. Se agrega un volumen de 10 a 20 veces (es decir, 10 mL a 20 mL de solvente por cada gramo de muestra de prueba) de cada solvente a cada matraz y los matraces se agitan a temperatura ambiente para su extracción. La extracción por agitación se realiza tres veces [por ejemplo, para 4 ± 1 h, 8 ± 1 h o 24 ± 2 h] dentro de un período de 24 ha 72 h usando el mismo volumen de solvente fresco cada vez. El extracto se recoge de cada		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
período de extracción y se agrupa. El disolvente se elimina por evaporación para obtener un residuo.		
El disolvente más adecuado para la prueba se determina en función de la masa de residuo obtenida. Se debe determinar el porcentaje de rendimiento del residuo. El disolvente que produce la mayor cantidad de residuo se elige como disolvente de extracción para las pruebas de sensibilización.		
Determine la solubilidad del residuo agregando aceite de oliva, acetona, metanol o dimetilsulfóxido.		
La solución que disuelve la mayor parte del residuo se usa como vehículo para las pruebas en el GPMT.		
Nota: Si la muestra de prueba se disuelve o degrada en acetona o metanol o si no se puede obtener una cantidad adecuada de residuo, se puede usar n-hexano o una mezcla 1: 1 de ciclohexano y 2-propanol como solvente de extracción.		
E.2.2 Extracción final		
E.2.2.1 General		
Hay dos métodos para preparar la solución de prueba del extracto de solvente orgánico.		
El método 1 es aplicable cuando la cantidad de residuo obtenida por extracción con solvente de una muestra de prueba y el peso de una muestra de prueba es relativamente altos porque se han obtenido cantidades suficientes de residuo.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Además, el Método 1 se recomienda especialmente para evaluar el riesgo de los dispositivos médicos que se usan repetidamente. Véase la referencia [56].		
El método 2 es aplicable cuando la cantidad de residuo obtenida por extracción con solvente de una muestra de prueba o el peso de una muestra de prueba es relativamente bajo. Ejemplos de estos últimos son lentes de contacto y lentes intraoculares.		
Para ambos métodos 1 y 2, en paralelo a la extracción de la muestra de prueba, la cantidad de disolvente igual al volumen total utilizado durante la extracción de la muestra de prueba se somete al mismo procedimiento de concentración que los extractos de prueba. Este solvente en blanco se usa como control negativo para cada fase de prueba.		
E.2.2.2 Preparación de la muestra de prueba de acuerdo con el Método 1		
Para el Método 1, la extracción se realiza cubriendo la muestra de prueba con un volumen de 10 a 20 veces del solvente apropiado (como se determina en la prueba de extracción preliminar) y agitando (agitando) a temperatura ambiente. El disolvente se recoge en otro matraz. El disolvente se intercambia tres veces [por ejemplo, después de la extracción durante 4 ± 1 h, 8 ± 1 h o 24 ± 2 h], y se repite para agitar a temperatura ambiente dentro de un		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Período de 24 a 72 h, dependiendo de la lixiviación y la estabilidad de las sustancias extraídas del material de prueba.		
Se obtiene un residuo evaporando el disolvente recogido. Se utiliza un evaporador rotativo a la temperatura más baja posible que proporciona evaporación controlada a presión reducida.		
El residuo se disuelve en un vehículo apropiado (aceite de oliva / acetona / etanol / dimetilsulfóxido) según lo determinado por el experimento de solubilidad en la prueba de extracción preliminar, para preparar una prueba de 10 % (p / p) y 20 % (p / p) solución para la fase de inducción intradérmica y para la fase de inducción tópica en el GPMT.		
Para la fase de desafío en el GPMT, se prepara una solución al 10 % (p / p) en el vehículo. La solución al 10 % se diluye adicionalmente con el vehículo para obtener soluciones de prueba al 1, 0.1, 0.01 y 0.001 %.		
E.2.2.3 Preparación de la muestra de prueba de acuerdo con el Método 2		
Para el Método 2, la extracción se realiza cubriendo la muestra de prueba con un volumen de 10 a 20 veces del solvente apropiado (como se determinó en la prueba de extracción preliminar) y agitando a temperatura ambiente durante (4 ± 2) h. El disolvente se recoge en un matraz. El procedimiento de extracción se repite tres veces dentro de un período de 24 h a 72 h utilizando el mismo volumen de solvente fresco cada vez. Los		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
extractos se agrupan en un matraz y el disolvente se evapora.		
Para la fase de inducción intradérmica, los extractos obtenidos se evaporan hasta que el número residual de mililitros del extracto sea igual o ligeramente inferior a la mitad del número original de gramos de la muestra utilizada (es decir, si se extraen 10 g de muestra de prueba, entonces el extracto solvente combinado se evapora hasta aproximadamente 5 mL), o se evapora por completo para obtener un residuo. Cuando se obtiene un residuo, este se disuelve en el vehículo adecuado (como se determina en la prueba de extracción preliminar) a 5 mL. Esta solución se considera como solución de prueba al 200 %.		
Además, la solución de prueba al 100 % se prepara diluyendo la solución de prueba al 200 % con el vehículo.		
Para la fase de inducción tópica, se utiliza la solución de prueba al 100 %. Tanto para la fase de inducción intradérmica como tópica, el vehículo en las soluciones de prueba de 200 y 100 % se reemplaza con aceite de oliva combinando la solución de prueba con un volumen igual de aceite de oliva y evaporando el vehículo bajo una corriente de gas nitrógeno.		
Para la fase de desafío, se utilizan las soluciones de prueba 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 %. La solución de prueba al 100 % se diluye con el vehículo para obtener soluciones de prueba al 50, 25, 12.5 y		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
6.25%. El vehículo en las soluciones de prueba no se reemplaza con aceite de oliva para la fase de desafío.		
E.3 Prueba de maximización en cobayo (GPMT)		
E.3.1 General		
El GPMT se realizará como se describe en el punto 7.3 con la excepción de la fase de desafío que se describe a continuación. La fase de desafío, utilizando el método de extracción con solvente, debe realizarse sin un vendaje oclusivo.		
E.3.2 Fase de desafío		
Dos semanas después de la aplicación de parche cerrado, todos los animales de prueba y control son desafiados con la muestra de prueba.		
Para el Método 1, una alícuota de 0.1 mL de las soluciones de prueba al 10 % (p/p), 1 y 0.1% se aplica tópicamente en el flanco derecho de cada prueba y animal de control negativo. Además, una alícuota de 0.1 mL de las soluciones de prueba al 0.01 y 0.001% y el vehículo de control negativo se aplican tópicamente en el flanco izquierdo de cada animal de prueba y control negativo.		
Para el Método 2, una alícuota de 0.1 mL de las soluciones de prueba al 100, 50 y 25 % se aplica tópicamente en el flanco derecho de cada animal de prueba y control negativo. Además, una alícuota de 0.1 mL de las soluciones de prueba del 12.5 y 6.25 % y el vehículo de control negativo se aplican tópicamente en el flanco izquierdo de cada animal de prueba y control negativo.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Tanto para el Método 1 como para el Método 2, los animales de control positivo se tratan con una alícuota de 0.1 mL de DNCB al 0.1 % en etanol en el flanco derecho y etanol en el flanco izquierdo.		
Nota: El desafío oclusivo se puede realizar de manera similar.		
ANEXO F		
INFORMACIÓN DE CONTEXTO		
F.1 Pruebas de irritación.		
Las pruebas de irritación dérmica en animales pequeños se realizan para ayudar a identificar materiales que pueden ser irritantes potenciales de la piel humana y / o del tejido de la mucosa. Un irritante primario es un material que produce cambios inflamatorios en la piel como resultado de un efecto perjudicial directo caracterizado por la presencia de inflamación, o en el caso de un irritante severo, vesiculación y / o necrosis.		
El conejo es el animal de prueba preferido, como lo demuestra la gran cantidad de información sobre irritación dérmica de este animal en el Registro de Efectos Tóxicos de Sustancias Químicas (RTECS). De más de 2 000 entradas RTECS, el 85 % informa resultados de pruebas con el conejo, el 7.5 % con humanos, el 4 % con el ratón y el 3 % con el cobayo. Como resultado, los conejos se han utilizado para generar la gran mayoría de los datos disponibles en la literatura abierta. La abrasión del sitio de prueba no es necesaria, ya que la evidencia indica respuestas		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
similares entre sitios desgastados y no desgastados.		
Las pruebas de irritación de la piel pueden dar resultados variables debido a la variación en varios factores relacionados con la prueba, como el huésped, la dosis de prueba, el tamaño del parche, el grado de oclusión, el tiempo de exposición, el vehículo, el tiempo de lectura y la calidad de la lectura.		
Por lo tanto, en las pruebas de irritación de la piel humana es importante incluir materiales de control positivos y negativos bien conocidos para poder comparar los resultados de las pruebas con los materiales de control, haciendo que los resultados sean relativos. Como control irritante positivo, el dodecil sulfato de sodio de pureza $\geq 99\%$ es la opción preferida, ya que es el irritante de control más utilizado en investigaciones clínicas. Véanse las referencias [1] [3] [36]. También es fácil y ampliamente disponible y libre de otros efectos adversos. El ácido nonanoico, que tiene un modo de acción diferente del dodecilsulfato de sodio, también puede usarse como control positivo. Véanse las referencias [19] [20].		
La exposición dodecilsulfato de sodio calibra el panel de voluntarios humanos y actúa como un punto de referencia. El dodecilsulfato de sodio está clasificado como irritante de la piel según el criterio de la UE (Directiva del Consejo 88/379 / CEE de 7 de junio de 1988 [23]). Sin embargo, no está claro si dodecilsulfato de sodio se encuentra		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
en el nivel umbral de respuesta, o cerca de él, en el que los productos químicos deben considerarse irritantes de la piel. Por lo tanto, en lugar de utilizar el material puro, es más apropiado tomar como punto de referencia el nivel mínimo de dodecilsulfato de sodio considerado por al menos un grupo regional (la UE) como un irritante agudo significativo para la piel, que es un 20 % (masa concentración) preparación acuosa. Véase la referencia [36].		
El uso de animales de laboratorio para las pruebas de irritación de la piel está disminuyendo debido al desarrollo de modelos <i>in vitro</i> y al uso más frecuente de voluntarios humanos. Véanse las referencias [11] [15]. La bioingeniería o los métodos de medición objetivos no invasivos se utilizan para cuantificar la respuesta irritante y, por lo tanto, disminuir la dependencia de las escalas de lectura visual más subjetivas. Véanse las referencias [13] [17] [18]. Sin embargo, se han obtenido décadas de experiencia con la prueba de irritación dérmica Draize en conejos albinos. Este método se describe en la referencia [7]. El material de prueba se introduce bajo parches de gasa a sitios intactos en el dorso recortado. Las solicitudes se realizan en tres conejos. Los parches se aseguran con cinta adhesiva y se envuelve todo el tronco del animal con un vendaje semioclusivo u oclusivo durante (4 ± 0.5) h. Después de 4 h, se retiran los parches, se limpian		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
los sitios de prueba y 1 h más tarde se califica cualquier reacción resultante de eritema y edema.		
Las reacciones también se clasifican a 24 ± 2 h, 48 ± 2 h y 72 ± 2 h.		
La prueba de irritación ocular de conejo se ha desarrollado para predecir la irritación ocular en el hombre. Véase la referencia [32].		
Draize (véase la referencia [31]) publicó un sistema de clasificación para ayudar en la evaluación de la irritación ocular. Se han publicado guías ilustradas como ayudas para evaluar las lesiones oculares.		
Se están desarrollando métodos <i>in vitro</i> alternativos para investigar los efectos de la irritación ocular. Véase la referencia [26].		
Recientemente, ICCVAM ha evaluado cuatro sistemas de prueba alternativos <i>in vitro</i> , dos de los cuales fueron suficientemente desarrollados para reemplazar las pruebas <i>in vivo</i> en animales para identificar irritantes y corrosivos severos. Estos ensayos son el método de prueba de opacidad y permeabilidad corneal bovina (BCOP) y el informe de evaluación del método de prueba ICCVAM [107]. Para irritantes débiles, todavía puede ser necesario un ensayo <i>in vivo</i> .		
Los datos humanos extensos sobre la irritación de la piel provienen del Instituto de Investigación de Monografías de Materiales de Fragancia sobre aceites esenciales y otros aromáticos publicados en <i>Food and Cosmetic Toxicology</i> . La referencia [5] proporciona información de fondo adicional. El		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
grupo de productos químicos del programa de la Guía de la OCDE aún no ha alcanzado un consenso sobre la necesidad de desarrollar una Guía de la OCDE para los efectos locales de la piel en voluntarios humanos.		
F.2 Pruebas de sensibilización para la sensibilización de la piel		
La sensibilización en el hombre ocurre después de exposiciones epicutáneas únicas o múltiples, y es iniciada y provocada por componentes del sistema inmune. Lo más importante, el hapteno (químico) debe ser sustantivo para la piel y poder penetrar. Luego reacciona con proteínas de la piel para formar complejos inmunogénicos. Las células de Langerhans en el borde epidérmico / dérmico presentan el antígeno a linfocitos específicos que luego se activan para iniciar las respuestas inmunes. Un pequeño porcentaje de estos linfocitos son células de memoria de larga vida, y estas sirven como activadores primarios durante la fase de desafío. Por lo tanto, las exposiciones posteriores pueden dar lugar a reacciones adversas mediadas por linfocinas liberadas por los linfocitos activados y otras células inflamatorias que son atraídas por el área de la lesión.		
En 1895, Jadassohn empleó la prueba de parche para revelar alergia de contacto al mercurio en un paciente clínico. Este enfoque innovador proporcionó la base científica para las pruebas posteriores dirigidas al diagnóstico y la predicción de la alergia de contacto en el hombre y los		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
animales. El desarrollo de pruebas prospectivas / predictivas para evaluar el potencial sensibilizante de los productos químicos siguió el trabajo pionero de Landsteiner y Chase [54], quienes corroboraron firmemente el uso del cobayo para estudiar la sensibilización de la piel.		
Magnusson y Kligman [55] exploraron muchas de las variables de las pruebas en cobayos y presentaron un procedimiento, la prueba de maximización en cobayo (GPMT), basada en inyecciones intradérmicas (con y sin adyuvante completo de Freund, FCA), seguido de la aplicación tópica de prueba de material a la misma área. El procedimiento original requiere un tratamiento previo del sitio de prueba si el material de prueba no es irritante. Por definición, supuestamente detecta sensibilizadores débiles, porque "débil" incluía una incidencia cero de reactores positivos. Es una prueba sensible y se ha utilizado ampliamente. El uso del adyuvante completo de Freund aumenta la sensibilidad del método de prueba y, en algunos casos, puede sobrestimar el potencial sensibilizante del compuesto en cuestión.		
En 1965, Buehler [46] abogó por el uso de la prueba de parche cerrado para proporcionar oclusión como un método para optimizar la exposición y para imitar los procedimientos utilizados en humanos (prueba de parche de insulto repetido humano: HRIPT). Se sugirió que el procedimiento de parche oclusivo era sensible y		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
predeciría con precisión los sensibilizadores moderados a severos, evitando así la exposición de sujetos humanos a la posibilidad de una reacción adversa durante HRIPT. Los datos presentados demostraron la superioridad de la oclusión sobre las inyecciones intradérmicas y la aplicación tópica de tipo abierto. No se utilizó la estimulación del sistema inmune por adyuvantes. Este método se establece como una técnica que es suficientemente sensible para detectar la mayoría de los sensibilizadores débiles y se ha demostrado que es lo suficientemente flexible como para ser utilizado en el proceso de evaluación de riesgos. Sin embargo, la prueba de parche cerrado (prueba de Buehler) es menos sensible en comparación con la GPMT. Véase la <i>referencia [51]</i>.		
Estas dos pruebas, la prueba de parche cerrado en los Estados Unidos y la GPMT en Europa, han sido las más utilizadas para la evaluación de la seguridad. También son los métodos de prueba preferidos en las directrices de prueba actuales de la OCDE y la UE. El resultado de los ensayos de sensibilización en cobayos depende de muchos factores técnicos y relacionados con los animales que explican la variación entre laboratorios en los resultados de las pruebas, p. cepa animal, sexo, edad, condiciones ambientales de prueba, sitio de prueba en el animal, método de depilación (recorte / afeitado o depilación química), tipo diseño del parche, cantidad de material de prueba, calidad de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
oclusión, tiempo de exposición y lectura de la respuesta del tejido.		
Se han empleado e investigado numerosas otras pruebas y todas ellas tienen sus defensores. Actualmente hay varios procedimientos que han sido reconocidos como aceptables para fines regulatorios, siempre que el procedimiento esté debidamente documentado y validado por el investigador. En todos los casos, los procedimientos deben realizarse de acuerdo con las referencias originales. A continuación, se incluye una lista de otras pruebas.		
La <i>referencia</i> [49] ofrece una actualización sobre las pruebas de sensibilización de la piel.		
1) Prueba adyuvante completa de Freund.		
2) Prueba de adyuvante dividido.		
3) Prueba epicutánea abierta		
4) Prueba de optimización de Mauer.		
5) Prueba de almohadilla en cobayo.		
6) Prueba de mejora de contacto acumulativo.		
7) Prueba de piel rayada (adyuvante y parche).		
8) Prueba de hinchazón del oído del ratón.		
Además de la prueba de parche ocluido GPMT y Buehler, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha aceptado ahora el ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA) como un método independiente alternativa a las pruebas actuales en cobayos, y como una mejora para el bienestar animal. Véase la <i>referencia</i> [88].		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
El LLNA ha sido validado para la determinación de la actividad sensibilizante de los productos químicos. Véanse las referencias [94] [95].		
La base científica para la prueba es la medición de la incorporación de 3H-metil timidina en los linfocitos en el drenaje de los ganglios linfáticos de ratones expuestos tópicamente a la muestra de prueba como una medida de sensibilización. No incluye una fase de desafío. El punto final de interés es un índice de estimulación que proporciona la proporción de incorporación de timidina en los ganglios linfáticos de los animales dosificados en comparación con la incorporación en los ganglios linfáticos de los animales de control. La prueba es positiva cuando el índice de estimulación excede 3 ($SI > 3$). Una evaluación intra e interlaboratorio de la LLNA ha demostrado una relación dosis-respuesta reproducible dentro y entre laboratorios. Véanse las referencias [64] [65] [70] [77] [81] [83] y [87]. Sin embargo, se han informado dificultades para diferenciar entre sustancias irritantes y alergénicas con el LLNA. Véanse las referencias [67] [77] [83].		
Por lo tanto, el LLNA puede dar resultados falsos positivos con irritantes y puede sobreestimar la alergenicidad de sustancias con propiedades irritantes y alergénicas. Véase la referencia [64]. Sin embargo, el LLNA tiene ventajas en comparación con los ensayos en cobayos debido a la menor duración de la prueba, un punto final más objetivo, se requiere menos sustancia de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
prueba y omite las inyecciones adyuvantes completas de Freund. Son posibles mejoras del procedimiento de prueba mediante el uso de análisis de marcadores de activación celular y citometría de flujo. Véanse las <i>referencias</i> [73] [74]. No se determina si pueden implementarse prácticamente en protocolos estándar de LLNA para toxicología de rutina. Por otro lado, el LLNA permite una elección más limitada de vehículos de prueba; La mayoría de los estudios han utilizado una mezcla de acetona y aceite de oliva. Un estudio reciente muestra la variabilidad de los resultados utilizando diferentes vehículos. Véase la <i>referencia</i> [82]. Además, con el LLNA no es posible estudiar la fase de desafío o los patrones de reactividad cruzada porque los animales se sacrifican después del tratamiento de inducción antes de que se cosechen los ganglios linfáticos.		
El ensayo de ganglios linfáticos poplíteos (PLNA) mediante administración subcutánea en la almohadilla del pie (Véanse las <i>referencias</i> [68] [71] [86]) es una alternativa al ensayo de ganglios linfáticos. En el último ensayo, además de la medición directa de la activación de los ganglios linfáticos, se pueden usar antígenos informadores para una mayor aclaración de la inmunomodulación causada por el químico bajo investigación. Véase la <i>referencia</i> [63].		
El proceso de evaluación de riesgos no debe basarse en un solo modelo o enfoque, sino que debe llevarse a cabo cuidadosamente para		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
proporcionar la máxima seguridad del consumidor. En general, esto implica modelos experimentales animales y humanos. Debe haber flexibilidad en la elección de modelos y enfoques, siempre que la justificación esté documentada y/o validada.		
Las pruebas negativas en cobayo, cuando se llevan a cabo adecuadamente, generalmente pueden ser definitivas si la concentración de prueba tiene un factor de seguridad suficiente sobre las condiciones de uso. Sin embargo, se debe evitar clasificar los materiales de prueba únicamente en función de la incidencia y/o gravedad, sin la debida consideración del uso eventual del producto.		
El riesgo, es decir, la incidencia y la gravedad, de la reacción alérgica al producto se determina principalmente con los siguientes cuatro factores: la potencia sensibilizante del alérgeno químico, su cantidad en el producto, la biodisponibilidad y las condiciones de exposición. Las potencias de sensibilización relativas de los productos químicos se pueden definir en términos de la concentración mínima de inducción requerida para inducir un nivel dado de sensibilización: cuanto menor es esta concentración, más potente es el sensibilizador. Véanse las referencias [45] [85]. Se demostró que la incidencia significativa de dermatitis de contacto alérgica se encontró en los usuarios cuando el nivel de residuos del alérgeno en el producto excedía su concentración de		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
inducción mínima obtenida por GPMT. Véase la <i>referencia</i> [56].		
Por otro lado, las pruebas predictivas de mezclas y productos están mucho menos validadas y se pueden realizar después de las pruebas de los ingredientes del producto. En consecuencia, el diseño de la prueba y la interpretación de los resultados están sujetos a incertidumbre, pero varios ejemplos documentan esta posibilidad. En experimentos con animales con extractos de acetona de un suéter que había causado dermatitis de contacto en humanos, se demostraron alérgenos (clorofenilhidrazonas de fosgeno). Véase la <i>referencia</i> [53]. En otro caso, donde los experimentos con animales con extractos de acetona / cloroformo de botas de goma habían causado dermatitis de contacto en el hombre, finalmente se descubrió que el mercaptobenzotiazol y el disulfuro de dibenzotiazilo eran los alérgenos causales. Véase la <i>referencia</i> [referencia]. La importancia de usar un solvente orgánico apropiado se demostró claramente. Los extractos hechos con solvente orgánico indujeron sensibilización de la piel en los cobayos, mientras que los extractos salinos no pudieron hacerlo.		
Las Directrices japonesas de pruebas biológicas básicas de materiales y dispositivos médicos (1995) (véase la <i>referencia</i> [24]) adoptan el procedimiento de preparación de la muestra con solvente orgánico seguido de la evaporación del		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
solvente para obtener el residuo, y el procedimiento de evaluación de riesgos al comparar el rendimiento porcentual de residuos del material con el porcentaje mínimo de dilución del residuo (mezcla) que todavía indujo la sensibilización de la piel en animales.		
Los métodos <i>in vitro</i> para las pruebas de sensibilización de la piel aún no están disponibles para el uso de rutina, pero en vista de las nuevas regulaciones en Europa que prohíben el uso de pruebas en animales para cosméticos, parece probable que haya nuevas estrategias disponibles para la identificación de sensibilizadores. Véanse las referencias [14] [108] [111] [112] [113].		
REFERENCIAS		
Referencias generales para irritación de piel y ojos, pruebas de sensibilización de piel.		
[1] AGNER, T., Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions. A study of patients with hand eczema, atopic dermatitis and controls, <i>Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh.</i> , 173 , pp. 1-26, 1992		
[2] World Medical Association, Declaration of Helsinki, <i>Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects</i> . Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, October 1983 and 41st World Medical Assembly, Hong Kong,		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
September 1989. Proc. XXVIth Conf., Geneva, 1993		
[3] LEE, C.H. and MAIBACH, H.I., The sodium lauryl sulfate model: an overview, <i>Contact Dermatitis</i> , 33 , pp. 1-7, 1995		
[4] MARZULLI, F.N. and MAIBACH, H.I., (eds.) <i>Dermatotoxicology</i> , 5th edn., Hemisphere Publ. Corp., 1996		
[5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) <i>Guideline for the testing of chemicals. Acute dermal irritation study in human volunteers</i> . Draft document, Nov. 1997		
[6] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) <i>Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization</i> , OECD Publications, 1992		
[7] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) <i>Guidelines for testing of chemicals No. 404, Acute skin irritation/corrosion</i> , OECD Publications, 1992		
[8] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), <i>Guidelines for testing of chemicals No. 405, Acute eye irritation/corrosion</i> , OECD Publications, 1992		
[9] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), <i>Guidelines for testing of chemicals No. 430, In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)</i> , OECD Publications, 2009		
[10] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), <i>Guidelines for testing of</i>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<i>chemicals No. 431, In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Publications, 2009</i>		
[11] PONEC, M., <i>In vitro</i> models to predict skin irritation, In: <i>The Irritant Contact Dermatitis Syndrome</i> . VAN DER VALK P.G.M. and MAIBACH H.I., (eds). CRC Press, Boca Raton, pp. 335-341, 1996		
[12] RUSSEL, W.M.S. and BURCH, R.L., <i>The principles of humane experimental technique</i> , 238 pp., Methuen, London, 1959		
[13] SERU, P.J. and JEMEC, G.B.E., <i>Handbook of non-invasive methods and the skin</i> , CRC Press, 1995		
[14] DE SILVA, O., BASKETTER, D.A., BARRATT, M.D. et al., <i>Alternative methods for skin sensitization testing</i> , The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19, <i>ATLA</i> , 24 , pp. 683-705, 1996		
[15] SIMION, F.A., <i>In vivo</i> models to predict skin irritation, in <i>The Irritant Contact Dermatitis Syndrome</i> . VAN DER VALK P.G.M. and MAIBACH H.I., (eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 329-334, 1996		
[16] SVENDSEN, O., GARTHOFF, B., SPIELMANN, H. et al., Alternatives to the animal testing of medical devices, <i>ALTA</i> , 24 , pp. 659-670, 1996		
[17] WAHLBERG, J.E., Assessment of skin irritancy: measurement of skin fold thickness, <i>Contact Dermatitis</i> , 9 , pp. 21-26, 1983		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[18] WAHLBERG, J.E. and WAHLBERG, E.N., Quantification of skin blood flow at patch test sites, <i>Contact Dermatitis</i> , 17 , pp. 229-233, 1987		
[19] WAHLBERG, J.E. and MAILBACH, H.I., Nonanoic acid irritation – A positive control at routine patch testing? <i>Contact dermatitis</i> , 6 , pp. 128-130, 1980		
[20] WAHLBERG, J.E., WRANGSJO, K. and HIETASOLA, A., Skin irritancy from nonanoic acid, <i>Contact dermatitis</i> , 13 , pp. 266-269, 1985		
[21] WEIL, S.C. and SCALA, R.A. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> , 12 , pp. 276-360, 1971		
[22] Test Methods for Evaluating Biological Safety of Medical Devices, Part 2: Skin Sensitivity Tests, <i>Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) memorandum</i> , Jimurenraku Iryokikishinsa No. 36, 2003/03/19		
[23] European Union, 88/379/EEC Council Directive, June 1988		
[24] <i>Japanese Guidelines of Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices</i> , 1995		
Bibliografía para pruebas de irritación cutánea y ocular		
[25] ISO 9394, <i>Ophthalmic optics — Contact lenses and contact lens care products — Determination of biocompatibility by ocular study using rabbit eyes</i>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[26] BALLS, M., BERG, N. and BRUNER, L.H. et al., Eye irritation testing: the way forward, <i>ATLA</i> , 27 , pp. 53-78, 1999		
[27] BASKETTER, D.A., WHITTLE, E., GRIFFITHS, H.A. et al., The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test, <i>Food Chem. Toxicol.</i> , 32 , pp. 769-775, 1994		
[28] BOTHAM, P.A., EARL, L.K., FENTEM, J.H., et al., Alternative methods for skin irritation testing: the current status. <i>ALTA</i> , 26 , pp. 195-212, 1998		
[29] BRUNER, L.H., KAIN, D.J., ROBERTS, D.A. et al., Evaluation of seven <i>in vitro</i> alternatives for ocular testing, <i>Fundam. Appl. Toxicol.</i> , 17 , pp. 136-149, 1991		
[30] DRAIZE, J.H., <i>Dermal Toxicity</i> . Association of food and drug officials of the US, FDA, Washington, DC, pp. 46-59, 1955		
[31] DRAIZE, J.H., <i>Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics</i> , Austin, Texas Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health, 1959		
[32] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, <i>Eye irritation testing</i> , Monograph 11, Brussels, Belgium, 1988		
[33] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, <i>Skin irritation</i> , Monograph 15, Brussels, Belgium, 1990		
[34] GERNER, L., GRAETSCHEL, G., KAHL, J. et al., Development of a decision support system for		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
the introduction of alternative methods into local irritancy/corrosivity testing strategies, Development of a relational database. <i>ALTA</i> , 26 , pp. 11-28, 2000		
[35] STEINBERG, M., AKERS, W.A., WEEKS, M. et al., A comparison of test techniques based on rabbit and human skin responses to irritants with recommendations, regarding the evaluation of mildly or moderately irritating compounds, <i>Animal Models in Dermatology</i> . MAIBACH H.I. (ed.), Churchill Livingstone, New York, pp. 1-11, 1975		
[36] YORK, M., GRIFFITHS, H.A., WHITTLE, E. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, <i>Contact Dermatitis</i> , 34 , pp. 204-212, 1996		
Bibliografía para Pruebas de irritación oral		
[37] NILSSON, R., FALLAN, J.O., LARSSON, K.S. et al., Electrical impedance — A new parameter for oral mucosal irritation tests, <i>J. Mater. Science: Materials in Medicine</i> , 3 , p. 278, 1992		
[38] ROY, M. and WHITE, H.I. Establishment of an improved technique for hamster mucous membrane irritation testing, <i>J. Dent. Res.</i> , 11 , pp. 365-1375, 1986		
Pruebas de irritación vaginal		
[39] CHVAPIL, M., CHVAPIL, T.A., OWEN, J.A. et al., Reaction of vaginal tissue of rabbits to inserted sponges made of various materials, <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , 13 , pp. 1-13, 1979		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[40] ECKSTEIN, P., JACKSON, M.C., MILLMAN, N. et al., Comparisons of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys, <i>J. Reprod. Fertil.</i> , 20 , pp. 85-93, 1969		
[41] KAMINSKY, M. and WILLIGAN, D.A., pH and the potential irritancy of douche formulations to the vaginal mucosa of the albino rabbit and rat, <i>Food Chem. Toxicol.</i> , 20 , pp. 193-196, 1982		
[42] MULLER, P., RAABE, G., HOROLD, J. et al., Action of chronic peracetic acid (wofasteril) administration on the rabbit oral mucosa, vaginal mucosa and skin, <i>Exp. Pathol.</i> , 34 , pp. 223-228, 1988		
Bibliografía para pruebas de sensibilización cutánea		
[43] ANDERSEN, K.E. and MAIBACH, H.I., Contact allergy predictive tests in guinea pigs, <i>Curr. Probl. Dermatol.</i> , 14 , 1985		
[44] ANDERSEN, K.E. and MAIBACH, H.I., Guinea pig sensitization assays, An overview, <i>Curr. Probl. Dermatol.</i> , 14 , pp. 263-290, 1985		
[45] ANDERSEN, K.E., VØLUND, A. and FRANKILD, S., The guinea pig maximization test with a multiple dose design, <i>Acta Derm. Venereol.</i> , 75 , pp. 463-469, 1995		
[46] BUEHLER, E.V., Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig, <i>Arch. Dermatol.</i> , 91 , pp. 171-175, 1965		
[47] BUEHLER, E.V., A rationale for the selection of occlusion to induce and elicit delayed contact		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
hypersensitivity in the guinea pig, A prospective test, <i>Curr. Probl. Dermatol.</i> , 14 , pp. 39-58, 1985		
[48] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, <i>Skin sensitization testing</i> , Monograph 14, Brussels, Belgium, 1990		
[49] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, <i>Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment</i> , Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000		
[50] FRANKILD, S., BASKETTER, D.A. and ANDERSEN, K.E., The value and limitations of rechallenge in the guinea pig maximization test, <i>Contact Dermatitis</i> , 35 , pp. 135-140, 1996		
[51] FRANKILD, S., VØLUND, A., WAHLBERG, J.E. et al., Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy, <i>Acta Derm. Venereol.</i> , 80 , pp. 256-262, 2000		
[52] KANIWA, M.A., MOMMA, J., IKARASHI, Y. et al., A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups: application to a case of rubber boot dermatitis, <i>Contact Dermatitis</i> , 27 , pp. 166-173, 1992		
[53] KOJIMA, S., MOMMA, J. and KANIWA, M.A., Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
screening method in animals, <i>Contact Dermatitis</i> , 23 , pp. 129-141, 1990 [published erratum appears in <i>Contact Dermatitis</i> , 23 , p. 383]		
[54] LANDSTEINER, K. and CHASE, M.W., Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds, <i>J. Exp. Med.</i> , 69 , p. 767, 1939		
[55] MAGNUSSON, B. and KLIGMAN, A.M., The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test, <i>J. Invest. Dermatol.</i> , 52 , pp. 268-276, 1969		
[56] NAKAMURA, A., MOMMA, J., SEKIGNCHI, H. et al., A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test, <i>Contact Dermatitis</i> , 31 , pp. 72-85, 1994		
[57] NEWMANN, E.A., BUEHLER, E.V. and PARKER, R.D., Delayed contact hypersensitivity in the vagina and skin of the guinea pig, <i>Fundam. Appl. Toxicol.</i> , 3 , pp. 521-527, 1983		
[58] POLIKANDRITOU, M., Enhancement of the sensitivity of the Buehler method by use of the Hill Top chamber, <i>Soc. Cosmetic Chem.</i> , 36 , pp. 151-168, 1996		
[59] RITZ, H.L. and BUEHLER, E.V., Planning, conduct and interpretation of guinea pig sensitization patch tests, In DRILL, V. and LAZAR, P. (eds.), <i>Current concepts in cutaneous toxicity</i> , Academic Press, New York, pp. 25-40, 1979		
[60] ROBERTS, D.W., Structure-activity relationships for skin sensitization potential of diacrylates and		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
dimethacrylates, <i>Contact Dermatitis</i> , 17 , pp. 281-289, 1987		
[61] ROBINSON, M.K., STOTTS, J., DANNEMAN, P.J. et al., A risk assessment process for allergic contact sensitization, <i>Food. Chem. Toxicol.</i> , 27 , pp. 479-489, 1989		
[62] ROBINSON, M.K., NUSAIR, T.L., FLETCHER, E.R. et al., A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization, <i>Toxicology</i> , 61 , pp. 91-107, 1990		
Bibliografía para LLNA		
[63] ALBERS, R., BROEDERS, A., VAN DER PIJL, A. et al., The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immunomodulation by chemicals, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> , 143 , pp. 102-109, 1997		
[64] BASKETTER, D.A., LEA, L.J., COOPER, K. et al., Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation, <i>Food. Chem. Toxicol.</i> , 37 , pp. 1167-1174, 1999		
[65] BASKETTER, D.A., ROBERTS, D.W., CRONIN, M. et al., The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations, <i>Contact Dermatitis</i> , 27 , pp. 137-142, 1992		
[66] BASKETTER, D.A. and SCHOLLES, E.W., Comparison of the local lymph node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
range of contact allergens, <i>Food. Chem. Toxicol.</i> , 30 , pp. 65-69, 1992		
[67] BASKETTER, D.A., SCHOLLES, E.W. and KIMBER, I., The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test, <i>Food. Chem. Toxicol.</i> , 32 , pp. 543-547, 1994		
[68] DE BAKKER, J.M., KAMMÜLLER, M.E., MULLER, E.S.M. et al., Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen-mitogen-, and graft-versus-hostreaction- induced-responses, <i>Virchows Archiv. B Cell Pathol.</i> , 58 , pp. 279-287, 1990		
[69] DEAN, J., TWERDOK, L.E., ANDERSEN, K.E. et al., <i>The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds</i> , NIH publication No. 99-494, Research Triangle Park, 1999, available at http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/llnadocs/llnar ep.pdf		
[70] DEARMAN, R.J., BASKETTER, D.A. and KIMBER I., Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment, <i>J. Appl. toxicol.</i> , 19 , pp. 299-306, 1999		
[71] DESCOTES, J., PATRIARCA, C., VIAL T. et al., The popliteal lymph node assay in 1996, <i>Toxicol.</i> , 119 , pp. 45-49, 1997		
[72] EDWARDS, D.A., SORANOO, T.M., AMORUSO, M.A. et al., Screening petrochemicals		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
for contact hypersensitivity potential: a comparison of the murine local lymph node assay with guinea pig and human test data, <i>Fundam. Appl. Toxicol.</i> , 23 , pp. 179-187, 1994		
[73] GERBERICK, G.F., GRUSE, L.W. and RYAN, C.A., Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry, <i>Methods</i> , 19 , pp. 48-55, 1999(a)		
[74] GERBERICK, G.F., GRUSE, L.W., MILLER, C.M. et al., Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment, <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> , 159 , pp. 142-151, 1999(b)		
[75] IKARASHI, Y., OHNO, K., MOMMA, J. et al., Assessment of contact sensitivity of two thiourea rubber accelerators: comparison of two mouse lymph node assays with the guinea pig maximization test, <i>Food Chem. Toxicol.</i> , 32 , pp. 1067-1072, 1994		
[76] IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T. and NAKAMURA, A., Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay, <i>Toxicol.Lett.</i> , 62 , pp. 53-61, 1992		
[77] IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T. and NAKAMURA, A., A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens, <i>Arch. Toxicol.</i> , 67 , pp. 629-636, 1993		
[78] IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T. and NAKAMURA, A., Application of sensitive mouse		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
lymph node assay for detection of contact sensitization capacity of dyes, <i>J. Appl. Toxicol.</i> , 16 , pp. 349-354, 1996		
[79] IKARASHI, Y., TSUKAMOTO, Y., TSUCHIYA, T. et al., Influence of irritants on lymph node cell proliferation and the detection of contact sensitivity to metal salts in the murine local lymph node assay, <i>Contact Dermatitis</i> , 29 , pp. 128-132, 1993		
[80] KIMBER, I. and BASKETTER, D.A., The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions, <i>Food Chem. Toxicol.</i> , 30 , pp. 165-169, 1992		
[81] KIMBER, I., HILTON, J., DEARMAN, R.J. et al., An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures, <i>Toxicol.</i> , 103 , pp. 63-73, 1995		
[82] LEA, L.J., WARBRICK, E.V., DEARMAN, R.J. et al., The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency of 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay, <i>Am. J. Contact Dermatitis</i> , 10 , pp. 213-218, 1999		
[83] LOVELESS, S.E., LADICS, G.S., GERBERICK, G.F. et al., Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial, <i>Toxicol.</i> , 108 , pp. 141-52, 1996		
[84] MONTELIUS, J., WAHLKVIST, H., BOMAN, A. et al., Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants, <i>Acta Derm. Venereol.</i> , 74 , pp. 22-27, 1994		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[85] ROBERTS, D.W., Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, <i>Contact Dermatitis</i> , 17 , pp. 281-289, 1987		
[86] VIAL, T., CARLEER, J., LEGRAIN, B. et al., The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study, <i>Toxicol.</i> , 122 , pp. 213-218, 1997		
[87] WARBRICK, E.V., DEARMAN, R.J., LEA, L.J. et al., Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations, <i>J. Appl. Toxicol.</i> , 19 , pp. 225-260, 1999		
[88] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), <i>Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay</i> , OECD Publications, 2002		
[89] RYAN, C.A., CRUSE, L.W., SKINNER, R.A. et al., Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay, <i>Food Chem Toxicol.</i> , 40 , pp. 1719-1725, 2002		
[90] WOOLHISER, M.R., MUNSON, A.E. and MEADE, B.J., Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, <i>Toxicology</i> 146 , pp. 221-227, 2000		
[91] TAKEYOSHI, M., NODA, S., YAMASAKI, K. et al., Advantage of using CBA/N strain mice in a nonradioisotopic modification of the local lymph node assay, <i>J. Appl. Toxicol.</i> , 26 , pp. 5-9, 2006		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[92] VAN OCH, F.M.M., SLOB, W., DE JONG, W.H. et al., A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins, <i>Toxicology</i> , 146 , pp. 49-59, 2000		
[93] DE JONG, W.H., VAN OCH, F.M.M., DEN HARTOG JAGER, C.F. et al., Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay, <i>Toxicol. Sc.</i> , 66 , pp. 226-232, 2002		
[94] DEAN, J.H., TWERDOK, L.E., TICE, R.R. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, <i>Regul. Toxicol. Pharmacol.</i> , 34 , pp. 258-273, 2001		
[95] HANEK, K.E., TICE, R.R., CARSON, B.L. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III Data analysis completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, <i>Regul. Toxicol. Pharmacol.</i> , 34 , pp. 274-286, 2001		
[96] ASTM F2148-07, <i>Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)</i>		
[97] COCKSHOTT, A., EVANS, P., RYANS, C.A. et al., The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective, <i>Human Exp. Toxicol.</i> , 25 , pp. 387-394, 2006		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[98] GERBERICK, G.F., RYAN, C.A., DEARMAN, R.J., and KIMBER, I., Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals, <i>Methods</i> , 41 , pp. 54-60, 2007		
[99] AZAM, P., PEIFFER, J.L., OURLIN, J.C. et al., Qualitative and quantitative evaluation of a local lymph node assay based on ex vivo interleukin-2 production, <i>Toxicology</i> , 206 , pp. 285-298, 2005		
[100] LEE, J.K., PARK, J.H., PARK, S.H. et al., A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry, <i>J. Pharmacol. Toxicol. Methods</i> , 48 , pp. 53-61, 2002		
Bibliografía para la prueba de irritación cutánea <i>in vitro</i>		
[101] HARTUNG, T., Statement on the validity of <i>in vitro</i> tests for skin irritation, ECVAM, Ispra, Italy, 2007 (http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf)		
[102] KANDAROVA, H., LIEBSCH, M., GERNER, I. et al., The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on <i>in vitro</i> skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, <i>ATLA</i> , 33 , pp. 351-367, 2005		
[103] COTOVIO, J., GRANDIDIER, M.-H., PORTES, P. et al., The <i>in vitro</i> acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
ECVAM validation process, <i>ATLA</i> , 33 , pp. 329-349, 2005		
[104] SPIELMANN, H., HOFFMANN, S. and LIEBSCH, M., <i>The ECVAM International Validation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test</i> , <i>ATLA</i> , 35 , pp. 559-601, 2007		
[105] ECVAM, Performance Standards for Applying Human Skin Models to <i>In vitro</i> Skin Irritation Testing, Final Version 25 May 2007, 13pp. Available under Downloads of study documents, available at(http://ecvam.jrc.it/ft_doc/2007-05-25_1_SIVS_Performance%20Standards_final.pdf)		
[106] R&D Systems, Human IL-1a/IL-1F1 Immunoassay, Catalog Number DLA50. For the quantitative determination of human interleukin 1 alpha (IL-1 α) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma. (http://www.rndsystems.com/pdf/dla50.pdf)		
[107] ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT, <i>In vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives</i> . NIH Publication No. 07-4517		
[108] BASKETTER, D. and MAXWELL, G., <i>In vitro</i> approaches to the identification and characterization of skin sensitizers, <i>Cutaneous and Ocular Toxicol.</i> , 26 , pp. 359-373, 2007		
[109] POUMAY, Y. and COQUETTE, A., <i>Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and</i>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
applied research, <i>Arch Dermatol Res.</i> , 298 , pp. 361-369, 2007		
[110] PONEC, M., Skin constructs for replacement of skin tissues for <i>in vitro</i> testing, <i>Adv Drug Deliv Rev.</i> , 54 Suppl 1: pp. 19-30, 2002		
[111] ASHIKAGA, T., YOSHIDA, Y., HIROTA, M, et al., Development of an <i>in vitro</i> skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, <i>Toxicology in vitro</i> , 20 , pp. 767-773, 2006		
[112] SAKAGUCHI, H., ASHIKAGA, T., MIYAZAWA, M. et al., Development of an <i>in vitro</i> skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, <i>Toxicology in vitro</i> , 20 , pp. 774-784, 2006		
[113] ASHIKAGA, T., SAKAGUCHI, H., OKAMOTO, K. et al., Assessment of the human Cell Line Activation Test(h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, <i>Alternatives to Animal Testing and Experimentation</i> , 13 , pp. 27-35, 2008		
[114] ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods. (http://ecvam.jrc.it/)		
[115] ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. (http://iccvam.niehs.nih.gov/)		
[116] JaCVAM, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods. Disponible en: http://jacvam.jp/about/about04.html		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
[117] OMORI, T., IKARASHI, Y., KANAZAWA, Y. et al., Validation studies on an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management, Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 21-25, 2007, Tokyo, Japan, <i>AATEX</i> , 14 , Special Issue, pp. 429-432, 2007		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA