



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE CONTROL
DE CALIDAD



UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA



DISEÑO E INTERPRETACION DE PRUEBAS FARMACOLOGICAS EN CONTROL DE CALIDAD

RED DE LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD DE
MEDICAMENTOS DEL SECTOR SALUD



MINISTERIO
DE SALUD

VOLUMEN I

SERIE DE DOCUMENTOS N° 3

Lima, Diciembre 1996



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE CONTROL
DE CALIDAD



UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA



DISEÑO E INTERPRETACION DE PRUEBAS FARMACOLOGICAS EN CONTROL DE CALIDAD

RED DE LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD DE
MEDICAMENTOS DEL SECTOR SALUD



VOLUMEN I

SERIE DE DOCUMENTOS N° 3

Lima, Diciembre 1996

*Este libro está dedicado a la memoria
del Señor Profesor Doctor Augusto Yi Chu
(1932-1996)*

© Ministerio de Salud
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jr. Cápac Yupanqui 1400, Jesús María
Telf. 471-3254 / Fax: 471-7443
Lima, Perú, 1996

**DISEÑO E INTERPRETACION DE PRUEBAS
FARMACOLOGICAS DE CONTROL DE CALIDAD**

COMITÉ DE REDACCIÓN

MSc. María Salas Arruz
Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas
Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño
Dr. Renán Manrique Mejía
MSc. César Puicón Montero
Dra. Alicia Darg Barbieri
Dra. Zoila Sánchez de Van Oordt
Dr. Ramón Zaldivar Sobrado

COMITÉ EDITOR

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas
MSc. María Salas Arruz
Dr. César Cabezas Sánchez
Dr. Carlos Carrillo Parodi
Dr. Jaime Chang Neyra

**MINISTERIO DE SALUD
ALTA DIRECCIÓN**

Dr. Marino Costa Bauer
Ministro

Dr. Alejandro Aguinaga Recuento
Viceministro

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Dr. Carlos Carrillo Parodi
Jefe

CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas
Director General

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Dr. Carlos Vidal Layseca
Rector

ESCUELA DE POSTGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

Dr. Enrique Machicado Zavala
Director

SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD

Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño
Director

PERFIL DE AUTORES Y EDITORES

Dr. César Cabezas Sánchez

Médico Cirujano, Master en Medicina, Especialista Enfermedades Infecciosas y Tropicales
Director General, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública. INS, MINSA
Profesor invitado de Medicina Tropical, Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dr. Carlos Carrillo Parodi

Médico Cirujano, Doctor en Medicina
Profesor Principal, Departamento Académico de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia
Jefe, Instituto Nacional de Salud

Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño

Médico Cirujano, Doctor en Medicina
Profesor Principal, Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Director Asociado de Ciencias, Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro. Universidad Peruana Cayetano Heredia
Director, Servicio de Control de Calidad, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dr. Jaime Oscar Chang Neyra

Médico Cirujano, Master of Science in Community Health in Developing Countries
Director Ejecutivo de Garantía de la Calidad y Certificación, Centro Nacional de Control de Calidad, INS, MINSA
Investigador, Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humbolt", Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dra. Alicia Darg Barbieri

Química Farmacéutica, Doctora en Farmacia
Decana Nacional, Colegio Químico-Farmacéutico del Perú.
Profesora Principal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Dr. Renán Manrique Mejía

Médico Cirujano, Doctor en Medicina
Profesor Principal, Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

MSc. César Puicón Montero

Magíster en Estadística, Licenciada en Educación-Matemáticas.
Profesor Asociado, Departamento Académico de Estadística y Demografía, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Profesor Principal, (cesante), Facultad de Ciencias Matemáticas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MSc. María Salas Anuz

Bióloga, Magíster en Fisiología
Profesor Asociado, Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Coordinadora Técnico-Administrativa, Servicio de Control de Calidad, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dra. Zoila Sánchez de Van Oordt

Química Farmacéutica, Doctora en Farmacia
Past Decana, Colegio Químico Farmacéutico del Perú.
Premio Hipólito Unanue y Daniel Alcides Carrión.
Presidenta, Sistema de Información Científica "Antonio Raimondi" (SICAR).

Dr. Ramón Zaldivar Sobrado

Médico Veterinario.
Profesor Principal de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Director Técnico, Ilender Corporation, Lima.
Representante, Colegio Médico Veterinario de Lima.

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

Médico Cirujano, Doctor en Farmacología
Profesor Principal DES, Coordinador Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Miembro, Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Director General, Centro Nacional de Control de Calidad. INS, MINSA

PRESENTACIÓN

El vertiginoso avance de la tecnología y la industria en las últimas décadas, así como el cada vez más importante rol del consumidor como agente de cambio, contribuyen para que en la actualidad tornemos nuestra mirada cada vez con mayor frecuencia a la calidad de los productos que consumimos, cuya evaluación requiere de la participación multidisciplinaria de especialistas de diversas ramas científico-tecnológicas del conocimiento: farmacéuticos, biólogos, farmacólogos, médicos humanos y veterinarios, ingenieros, químicos, biotecnólogos y otros.

El libro trata sobre los ensayos farmacológicos aplicados al control de calidad, tema poco desarrollado en el país, por lo que la obra tiene por objeto difundir conocimientos sobre aspectos básicos de diseño e interpretación de las pruebas farmacológicas aplicables al control de calidad de medicamentos, biológicos, alimentos, cosméticos, productos industriales y recursos naturales terapéuticos, abordando en forma sencilla y práctica, una amplia variedad de tópicos que incluyen a las pruebas en órganos aislados y animales intactos, el biodosaje, la evaluación de la toxicidad letal, cutánea y ocular, la prueba de Endotoxinas Bacterianas por la Técnica de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) que actualmente viene reemplazando a la prueba de pirógenos en conejos; el diseño estadístico, los estudios de biodisponibilidad, y las principales pruebas y ensayos requeridos por la Farmacopea Americana USP, cuya edición 23 constituye la obra oficial de mayor exigencia en el área farmacéutica.

El Instituto Nacional de Salud y la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en cumplimiento de sus objetivos institucionales de difusión del conocimiento científico-tecnológico para la formación de recursos humanos calificados en salud, así como impulsar la investigación científica nacional, aúnan esfuerzos al presentar este libro, en el que se reúnen las ponencias presentadas en el Curso "Diseño e Interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad"¹, que fuera organizado por el Servicio de Control de Calidad y la Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro de la Universidad, bajo el auspicio del Instituto Nacional de Salud.

Lima, Diciembre de 1996

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas
MSc. María Salas Arruz
Editores

¹ Casa Honorio Delgado, UPCH, Lima 13 al 16 de marzo de 1996.

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



No. 212-96-J-IPD/INS

RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 09 de *setiembre* de 1996

CONSIDERANDO :

Que, el Instituto Nacional de Salud, a través de su Centro Nacional de Control de Calidad en colaboración con el Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y dentro del marco del convenio de cooperación vigente entre ambas instituciones, han formulado el documento Diseño e Interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad.

Que en tal virtud resulta necesario aprobar y difundir dicho documento, para su utilización.

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento de Organización y Funciones del INS, aprobado por R.M. N° 178-95-SA/DM; y

Estando a lo acordado:

SE RESUELVE:

h
Artículo 1º.- Aprobar el documento titulado: "Diseño e interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad", perteneciente a la Serie de Documentos del Instituto Nacional de Salud.

Artículo 2º.- Disponer la impresión y distribución del documento a que se refiere el numeral anterior.

Regístrese y comuníquese.



Carroll

DR. CARLOS CARRILLO PARODI
JEFE
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

AGRADECIMIENTOS

El Comité Editor expresa su agradecimiento a los señores doctores Enrique Machicado, Inés González de Merino, Jenny Castañón, Hayde Velásquez, Jorge Castillo y León Villegas, por su participación y colaboración en el Curso "Diseño e Interpretación de Pruebas Farmacológicas en Control de Calidad".

A Verónica Vásquez, Erika Wu, Rosa Mosqueda, Jorge Sánchez, Dora Maiúrtua, Irma Fernández y Daniel Palacios por el apoyo brindado.

Al Colegio Químico Farmacéutico del Perú, Colegio Médico Veterinario de Lima; Colegio de Biólogos del Perú; a la Sociedad Peruana de Farmacología y Terapéutica Experimental, Compañía Oscar R. Lindley e Hijos y Laboratorios Abeefe, por el auspicio otorgado.

Esta obra se realizó en el marco del Convenio de Cooperación suscrito entre el Instituto Nacional de Salud y la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

ÍNDICE

VOLUMEN I

Presentación	6
Resolución Jefatural	7
Agradecimientos	8

CAPÍTULO I

Pruebas farmacológicas exigidas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)	10
---	----

CAPÍTULO II

Diseño e interpretación de pruebas en órganos aislados y animales intactos	28
--	----

CAPÍTULO III

Introducción al biodosaje	32
---------------------------------	----

CAPÍTULO IV

Toxicidad: Diseños experimentales y aplicación de programas estadísticos computarizados	39
---	----

CAPÍTULO V

Pirógenos y ensayo de endotoxinas bacterianas (LAL) en la industria farmacéutica	43
--	----

VOLUMEN II

Presentación	5
Resolución Jefatural	7
Agradecimientos	8

CAPÍTULO VI

Ensayos de toxicidad cutánea y ocular: Aplicación en la industria cosmética y farmacéutica	10
--	----

CAPÍTULO VII

Diseño estadístico	18
--------------------------	----

CAPÍTULO VIII

Farmacocinética y farmacodinamia : Su importancia en la terapéutica	28
---	----

CAPÍTULO IX

Diseño de pruebas de Biodisponibilidad.....	41
---	----

CAPÍTULO X

Mesa Redonda : Rol de las pruebas farmacológicas en el Control de calidad	44
---	----

CAPÍTULO I

PRUEBAS FARMACOLÓGICAS EXIGIDAS POR LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS (USP)

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

PRUEBAS FARMACOLOGICAS EXIGIDAS POR LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

ASPECTOS LEGALES

En el Perú, el sistema de control de calidad de medicamentos, artículos médicos, reactivos de diagnóstico y productos biológicos se encuentra regulado por el **Decreto Ley 25596** (4-7-1992). Este dispositivo legal dispone el control posterior a la obtención del Registro Sanitario (Control Post-Registro), normando los requisitos para obtención del Registro Sanitario de medicamentos, alimentos, así como la autorización de importación, y establece los patrones de referencia a emplearse para la inscripción, reinscripción y formulación de medicamentos (especialidades farmacéuticas, medicamentos genéricos y productos galénicos):

Asimismo establece como Farmacopeas Oficiales en el Perú a la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP) y al USP Drug Information, Farmacopeas Belga, Alemana, Europea, Francesa, Helvética, Japonesa y de la OMS.

Por definición legal, las farmacopeas antes indicadas, son vigentes en el Perú en la misma fecha en que son oficiales en el país de origen. Esta definición se aplica tanto a la edición en curso de la Farmacopea como a los suplementos que van apareciendo periódicamente. Así por ejemplo, para el caso de la Farmacopea USP XXIII y sus suplementos se han establecido las siguientes fechas de aprobación y uso legal:

USP XXIII y Suplementos	Aprobado	Uso legal
USP XXIII	01/06/1994	01/01/1995
Suplemento 1	01/11/1994	01/01/1995
Suplemento 2	15/03/1995	15/05/1995
Suplemento 3	15/09/1995	15/11/1995
Suplemento 4	15/03/1996	15/05/1996

ENSAYOS BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS EN LA USP XXIII

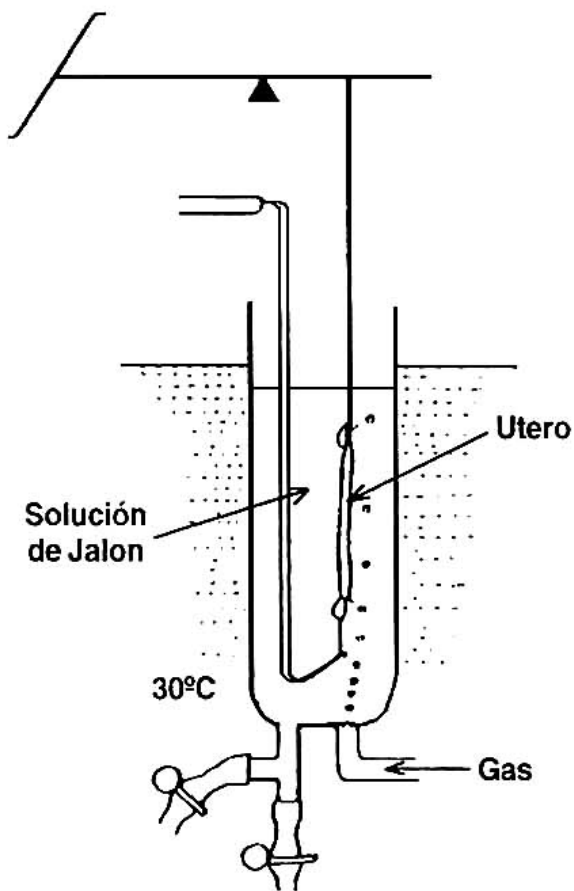
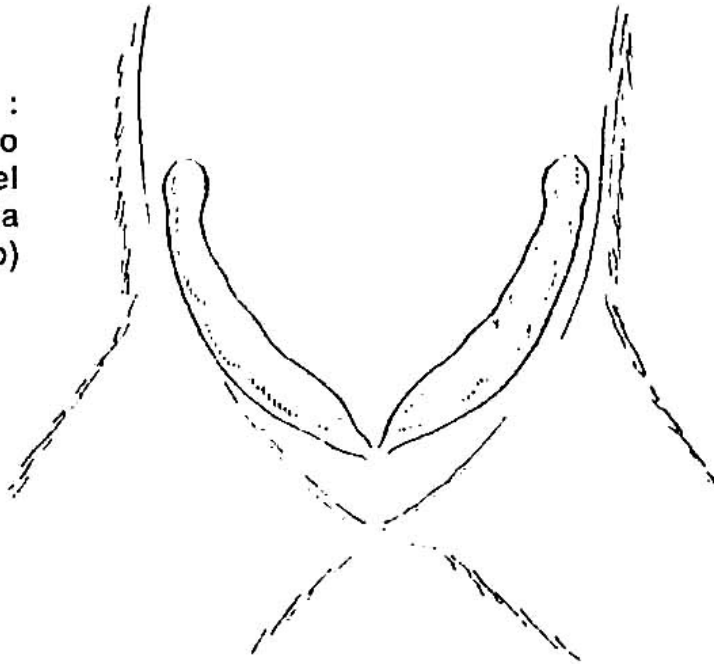
Los ensayos biológicos incluidos en la Farmacopea Americana, tienen como objetivo la determinación cualitativa de una característica específica de un producto biológico o del contenedor en el cual este producto biológico es comercializado (Ejemplo: equipos de transfusión).

Estos ensayos están diseñados para determinar con un alto grado de certeza, la ausencia o presencia de cierto tipo de actividad (antibacteriana, presora, etc.), o la calidad (no antigenicidad, toxicidad, etc.), o constituyentes (substancias depresoras, pirógenos, etc.). De ello, que las pruebas microbiológicas, farmacológicas y toxicológicas, así como las pruebas de análisis estadístico son agrupadas bajo el título genérico de "Ensayos Biológicos".

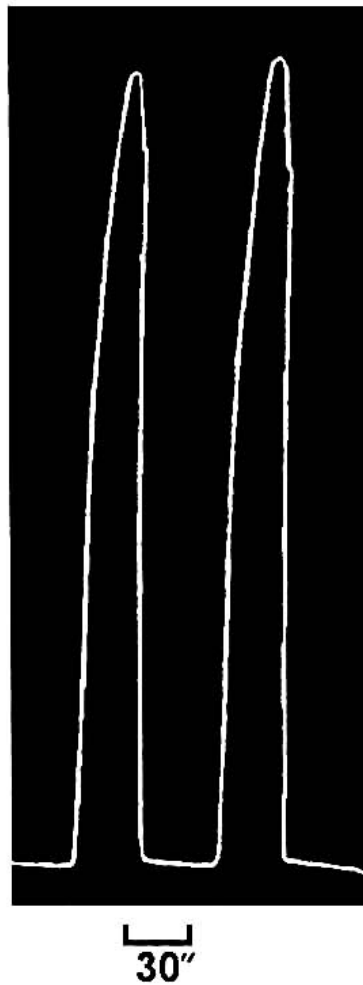
Algunos ensayos biológicos utilizan animales de laboratorio en ensayos *in vivo* (ej: actividad presora en pollo) o *in vitro* en órganos aislados (ejemplo: actividad ocitócica en útero aislado de cobayo, ver figura 1), mientras que otros utilizan microorganismos. En las tablas 1 al 4, se listan las pruebas biológicas incluidas en la Farmacopea Americana. En la Tabla 1 se listan las pruebas microbiológicas; en las Tablas 2 y 3 se listan las pruebas farmacológicas generales y las pruebas requeridas por los equipos de transfusión e infusión. En la Tabla 4 se listan los principales métodos matemáticos y estadísticos aplicables al diseño y análisis de ensayos biológicos. En el Anexo 1 se muestra un sumario de procedimientos farmacológicos requeridos por algunos productos farmacéuticos obtenidos de fuentes naturales (digital, insulina, glucagon, oxitocina, vasopresina, pituitaria posterior, corticotropina, heparina, protamina, HCG y aceite de hígado de bacalao).

La prueba de LAL (Limulus amebocyte lisate) es revisada en extenso por la MSc. María Salas en el Capítulo V de esta obra, por lo que no incluimos mayores detalles de esta prueba en este capítulo.

Figura 1 :
La preparación del útero
aislado de rata (según el
Staff de Farmacología de la
Universidad de Edimburgo)



Aparato de órganos aislados y
preparación de útero aislado
sumergido en solución de
Jalon; oxígeno con 5% de CO₂.



Un registro típico que mues-
tra la contracción obtenida
con metil-B-methylcholine

**TABLA 1:
ENSAYOS BIOLÓGICOS EXIGIDOS POR LA FARMACOEPA AMERICANA -
EDICION XXIII: PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS**

CODIGO USP XXII	NOMBRE DE LA PRUEBA	TIPO DE PRUEBA/ MODELO
81	Ensayo de potencia antibiótica : Ensayo en placa	Microbiológico/ in vitro
81	Ensayo de potencia antibiótica : Ensayo turbidimétrico o en tubo	Microbiológico/ in vitro
	Ensayo de Pantotenato de calcio	Microbiológico/ turbidimétrico
115	Ensayo de Dexpantenol en preparaciones de multivitamínicos	Microbiológico/ turbidimétrico in vitro
171	Ensayo de actividad de Vitamina B12 (Cianocobalamina)	Microbiológico/ turbidimétrico

A continuación revisaremos las principales pruebas farmacológicas exigidas por la Farmacopea Americana (edición XXIII).

<87> PRUEBAS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

La Farmacopea Americana contempla tres pruebas diferentes de reactividad biológica *in vitro*

- Prueba de difusión en agar
- Prueba de contacto directo
- Prueba de elusión

Estas pruebas se basan en la utilización de cultivos de células L-929 (ATCC línea celular CCL 1, NTC clon 929), midiéndose la respuesta citotóxica luego de la exposición frente a extractos de los productos a ensayar. Como estándares negativo y positivo se utilizan: USP Negative Bioreaction RS y USP Positive Bioreaction RS.

**TABLA 2:
ENSAYOS BIOLÓGICOS EXIGIDOS POR LA FARMACOPÉA AMERICANA -
EDICIÓN XXIII: PRUEBAS FARMACOLÓGICAS**

CODIGO USP XXIII	NOMBRE DE LA PRUEBA	TIPO DE PRUEBA/ MODELO
I. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS GENERALES		
151	Prueba de Pirógenos en conejos	Conejos/in vivo
85	Prueba de Endotoxinas Bacterianas (LAL)	In vitro/ Farmacológico/ Bioquímico
87	Prueba de Reactividad Biológica in vitro	Cultivo celular/ in vitro
87*	Prueba de Difusión en Agar	Citotoxicidad celular/in vitro
87*	Prueba de Contacto Directo	Citotoxicidad celular/in vitro
87*	Prueba de Elusión	Citotoxicidad celular/in vitro
88	Pruebas de Reactividad Biológica in vivo	Ratones o conejos/in vivo
88*	Prueba de Inyección Sistemática	Ratón/in vivo
88*	Prueba intracutánea	Conejo/in vivo
88*	Prueba de Implantación	Conejo/in vivo
88*	Prueba de Seguridad (biológicos)	Conejo/in vivo
101	Prueba de Sustancias Depresoras	Gato adulto hembra no gravida/in vivo
121	Ensayo de Insulina (Método de glucosa sanguínea en conejo)	Conejos/in vivo
141	Prueba de Adecuabilidad biológicas de proteínas	Ratas/ nutricional

Para la extracción se utiliza NaCl 0.9% para inyección (estéril, apirógeno) o medio de cultivo libre de suero, por 24 horas a temperatura ambiente. Otra modalidad emplea medio de cultivo suplementado con suero, e incubación a 37°C durante 24 horas. Otros equipos necesarios para la ejecución de las pruebas incluyen:

- autoclave,
- incubador con fuente de CO₂
- tubos de vidrio clase 1 (cultivo).

<87> PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR

Esta prueba se aplica a cierres elastoméricos en una variedad de formas, y sus características principales incluyen:

- Usa células en cultivo, que crecen en medio de cultivo conteniendo no más de 2% de agar. El agar funciona como una cubierta para proteger las células del daño mecánico que sigue a la difusión de sustancias químicas filtrables de los especímenes poliméricos.
- Los extractos del materiales bajo ensayo son aplicados en papel de filtro.
- Usa porciones de elastómero de 100 mm² de área.
- Se aplican hasta 3 discos por placa, e incluye controles positivos y negativos.
- Se mide el efecto sobre las células a las 24 horas a 37°C.
- La reactividad biológica se mide como degeneración celular y malformación en una escala de 0 a 4 (desde ningún efecto hasta células dañadas severamente hasta 1 cm por fuera del disco de papel de filtro).

<87> PRUEBA DE CONTACTO DIRECTO

El método se emplea para extracción y ensayo simultáneo que sigue a la aplicación de sustancias químicas filtrables de los especímenes poliméricos, mezcladas con medio suplementado con suero. Esta prueba se aplica a cierres elastoméricos en una variedad de formas, y sus características principales incluyen:

- Usa porciones de elastómero de 100 mm² de área.
- Se incluyen controles positivos y negativos.

**TABLA 3:
ENSAYOS BIOLÓGICOS EXIGIDOS POR LA FARMACOPÉA AMERICANA -
EDICIÓN XXIII: PRUEBAS FARMACOLÓGICAS**

CODIGO USP XXIII	NOMBRE DE LA PRUEBA	CODIGO DE PRUEBA ASOCIADA REQUERIDA
II. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS PARA DISPOSITIVOS DE TRANSFUSION E INFUSION		
161	DISPOSITIVOS PARA TRANSFUSION E INFUSION :	333
	Requieren adicionalmente :	71
	1) Endotoxinas bacterianas o Prueba de pirógenos	85
	2) Seguridad :	151
	• Pruebas generales de seguridad	88
	• Pruebas de reactividad biológica in vitro	87
	• Pruebas de seguridad biológica in vivo	88
	3) Otros requerimientos :	
	• Contenedores - Plásticos	661
	• Cierres elastoméricos para inyección	381
	4) Esterilidad	71

- Usa placas de 35 mm de diámetro conteniendo monocapas de células en cultivo fresco.
- Se adiciona el extracto diluido en medio de cultivo. Se ensaya por duplicado.
- Se incuba 24 horas a 37°C en incubador bajo 5% de CO₂.
- Para la interpretación se emplea la escala de 0 a 4 de la prueba de difusión en el agar. La muestra cumple si en ninguna de las placas se obtiene valor > 2 (lesión moderada).

TABLA 4:
ENSAYOS BIOLÓGICOS EXIGIDOS POR LA FARMACOPÉA AMERICANA -
EDICIÓN XXIII: MÉTODOS MATEMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS APLICABLES
AL DISEÑO Y ANÁLISIS DE ENSAYO BIOLÓGICOS

CODIGO USP XXIII	NOMBRE DE LA PRUEBA	TIPO DE PRUEBA/ MODELO
111	Diseño y análisis de ensayos biológicos	Estadística
111*	Cálculo de potencia de un ensayo simple	Estadística
111*	Cálculo de potencia de determinaciones directas de la dosis máxima	Estadística
111*	Cálculo de potencia de ensayos indirectos de la relación Log dosis - respuesta (DL_{50} , DE_{50})	Estadística

<88> PRUEBAS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*

Estas pruebas se aplican a elastómeros, plásticos y otros polímeros que están en contacto directo o indirecto con el paciente, o por la inyección de extractos específicos preparados a partir del material bajo ensayo, y consideran un área de espécimen a ensayar, ó 0,1 g de elastómero ó 0,2 g de plástico por mL de fluido de extracción. Como precaución general debe tenerse especial cuidado en evitar que los fluidos y materiales sufran contaminación microbiana.

Asimismo se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones para la evaluación de los materiales plásticos:

- Existen seis clases diferentes aceptadas por la USP (Ver Tabla 5). Las pruebas se relacionan directamente con el uso indicado de los artículos plásticos.
- Las técnicas de ensayo y los extractantes a emplear varían según la clase de plástico empleado y su resistencia al calor.
- Los fabricantes están obligados a indicar la clase de plástico y la temperatura de extracción (50, 70 ó 121°C).

**TABLA 5:
PRUEBAS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*
CLASIFICACION PARA PLÁSTICOS**

Clases de Plástico ^a						Pruebas a ser efectuadas			
I	II	III	IV	V	VI	Material a ensayar	Animal	Dosis	Procedimiento ^b
x	x	x	x	x	x	Extracto de muestra en Cloruro de Sodio para inyección	Ratón	50 mL/kg	A (iv)
x	x	x	x	x	x		Conejo	0.2 mL/animal a cada uno de 10 sitios	B
	x	x	x	x	x	Extracto de Muestra en solución de Alcohol en Cloruro de Sodio para inyección (1:20)	Ratón	50 mL/kg	A (iv)
	x	x	x	x	x		Conejo	0.2 mL/animal a cada uno de 10 sitios	B
		x	x	x		Extracto de muestra en Polietilén glicol 400	Ratón	10 mL/kg	A (ip)
				x	x		Conejo	0.2 mL/animal a cada uno de 10 sitios	B
		x	x	x	x	Extracto de muestra en aceite vegetal	Ratón	50 mL/kg	A (ip)
			x	x	x		Conejo	0.2 mL/animal a cada uno de 10 sitios	B
			x	x		Implante (tiras) de muestra	Conejo	4 tiras/animal	C

^a Pruebas requeridas por cada clase son indicadas por "x" en las columnas apropiadas.

^b Leyenda: A (ip) Prueba de inyección sistémica (intraperitoneal); A (iv) Prueba de inyección sistémica (intravenosa); B- Prueba intracutánea (intracutánea); C-Prueba de Implantación (implantación intramuscular)

- La clasificación no es aplicable a plásticos cuyo uso esté indicado para contenedores para productos orales o tópicos, o que puedan ser usados como parte integral de una formulación.
- La clasificación de la Tabla 5 no se aplica para elastómeros naturales, los que son ensayados sólo en NaCl y aceite vegetal.
- Los líquidos para extracción empleados en pruebas de reactividad *in vivo* incluyen:
 - a) Polietilenglicol 400
 - b) Cloruro de sodio para inyección
 - c) 1:20 alcohol en NaCl para inyección.
 - d) Vehículo del producto (cuando corresponde)

Tres son las pruebas exigidas por la Farmacopea Americana en su edición XXIII:

- Prueba de Inyección sistémica
- Prueba intracutánea
- Prueba de implantación

<88> PRUEBA DE INYECCIÓN SISTÉMICA

Se indica para determinar las respuestas biológicas sistémicas de animales, a los plásticos y otros polímeros, mediante la inyección de una dosis única de extractos específicos preparados de una muestra, seguida de la observación de la ocurrencia de muerte o de otros efectos producidos hasta las 72 horas post inyección.

Entre las características principales de la prueba se incluyen:

- Usa grupos de 5 ratones albinos c/u de 17 a 23 g.
- Se inyecta NaCl para inyección a un grupo de 5 ratones (grupo blanco).
- Se observan los síntomas a las 4, 24, 48 y 72 horas post inyección.
- El producto cumple la prueba si ningún animal presenta efectos sistémicos.
- Si cualquier animal presenta efectos sistémicos o no más que 1 muere, se debe repetir la prueba con grupos de 10 ratones.
- En la repetición, ningún animal debe mostrar efectos biológicos significativos.

<88> PRUEBA INTRACUTÁNEA

Se indica para determinar las respuestas biológicas locales de animales, a los plásticos y otros polímeros, mediante la inyección por vía intracutánea de una dosis única de extractos específicos preparados de una muestra.

Para la prueba se emplean 5 conejos sanos por muestra y la piel de los animales debe estar libre de irritación mecánica o trauma. Asimismo, pueden ensayarse múltiples extractos en la piel de un animal (5 blancos y 5 pruebas, 200 uL, intracutáneo).

Entre las características principales de la prueba se incluyen:

- Dilución del extracto en Polietilenglicol 400 de cada gramo de material en 7,4 volúmenes de NaCl.
- Registro a las 24, 48 y 72 horas de la presencia de eritema, edema y necrosis o escaras, utilizando una escala de 0 a 4 para cada parámetro.
- Obtener el puntaje medio para cada animal, dividiendo el puntaje total acumulado entre 12 (muestra y blanco).
- El producto cumple la prueba si la diferencia entre el puntaje medio obtenido para la muestra no difiere en más de 1,0 punto del puntaje medio obtenido con el blanco.

<88> PRUEBA DE IMPLANTACIÓN

Esta prueba se indica para evaluar la reacción del tejido vivo a los plásticos y otros polímeros mediante la implantación de la muestra bajo ensayo, dentro del tejido animal (músculos paravertebrales en conejos adultos, de peso mayor de 2,5 kg).

En la prueba se implantan tiras de plástico de no menos de 10 x 1 mm mediante una aguja hipodérmica biselada y con trocar (15 - 19 G). Se usan tiras de muestras de ensayo y control negativo (8 tiras de la muestra y 4 tiras de USP Plástico Control Negativo RS), 4 son implantadas en el músculo paravertebral de cada hemicuerpo del conejo.

Después de 120 horas se sacrifica al animal y se evalúa la respuesta midiendo la encapsulación, y registrando la presencia o ausencia de hemorragia, necrosis, decoloración e infección en la zona del implante.

El puntaje medio registrado para cada animal se obtiene sumando el puntaje individual y dividiendo el puntaje entre 8 para la muestra y el blanco respectivamente.

El producto cumple la prueba si la diferencia entre el puntaje medio obtenido para las muestras no difiere en más de 1,0 punto, o si la diferencia entre el valor medio de la muestra y el blanco no son mayores de 1,0.

<88> PRUEBA DE SEGURIDAD PARA BIOLÓGICOS

Se indica para detectar cualquier reactividad biológica inesperada e inaceptable en un artículo y para garantizar la seguridad de biológicos y productos derivados de biotecnología.

La prueba se efectúa en ratones albinos de 17 a 23 g, mediante inyección i.v. de 0,5 mL de solución de prueba/ratón (aguja 26 G) seguida de observación durante 48 horas, y registro de la supervivencia y síntomas de toxicidad anormal. Si uno o más animales mueren o registran toxicidad anormal, la prueba debe repetirse con grupos de 10 animales (ratones de 19 a 21 g).

En la repetición si ningún animal muere o muestra signos de toxicidad, el producto cumple el requerimiento.

Para biológicos en USA, se usan un mínimo de 2 ratones (17 a 23 g) y 2 cobayos (peso no menor de 400 g), y se aplica 0,5 mL i.p., observándose a los animales por no menos de 7 días. El producto cumple la prueba si todos los animales sobreviven y no presentan síntomas de toxicidad anormal.

<101> PRUEBA DE SUBSTANCIAS DEPRESORAS

Un grupo de productos farmacéuticos de origen natural, así como otros de origen sintético, pueden contener pequeñas, pero significativas cantidades de sustancias depresoras de la presión arterial, parecidas a histamina (también llamadas “cuerpos histaminoides”).

Los siguientes productos deben cumplir con los requerimientos oficiales de la Farmacopea americana, para la prueba de sustancias depresoras:

- Cloramfenicol
- Cloramfenicol succinato sódico
- Cloramfenicol succinato sódico estéril
- Doxorubicina hidrocloreuro para inyección
- Doxiciclina Hyclato para inyección
- Lincomicina hidrocloreuro
- Lincomicina hidrocloreuro para inyección
- Minocycline hidrocloreuro estéril
- Colistimethate sódico
- Estreptomicina sulfato
- Estreptomicina sulfato inyección
- Tetraciclina hidrocloreuro para inyección
- Tetraciclina hidrocloreuro estéril
- Viomicyna sulfato
- Viomicyna sulfato estéril

Desde el punto de vista de la fabricación, resulta impráctico el remover completamente los “cuerpos histaminoides”, por lo que se han establecido cantidades límites que pueden estar presentes en los preparados farmacéuticos indicados previamente, luego del análisis biológico.

La prueba USP de sustancias depresoras se realiza en gatos adultos anestesiados con Pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.) y preparados para registro directo de la presión arterial (usualmente carotídea). La sensibilidad del animal es determinada mediante inyecciones sucesivas de histamina hidrocloreuro, a intervalos definidos y uniformes de tiempo, de no menos de 5 minutos. Las dosis de ensayo de histamina equivalen a 1,0 ug de histamina base/mL, representando 0,05; 0,1 y 0,15 ug de histamina base/kg de animal de ensayo. La dosis media es repetida varias veces para asegurar la uniformidad de la respuesta. Si esta no es satisfactoria, el gato debe ser descartado.

A un animal que cumple los requerimientos de uniformidad de la respuesta, se le aplican dos dosis de la sustancia bajo ensayo diluida en solución salina isotónica. La concentración de la dilución es especificada en la monografía de cada producto. Las dosis se intercalan con las dosis de la histamina estándar (0,1 ug/kg de histamina base).

Si el promedio de la caída de la presión arterial de la dilución del medicamento bajo ensayo no es mayor que la obtenida por 0,1 ug/kg de histamina base. la sustancia ensayada cumple los requerimientos del ensayo de sustancias depresoras.

<141> PRUEBA DE ADECUABILIDAD BIOLÓGICA

Esta prueba ha sido designada para establecer la adecuada calidad del producto hidrolizado de proteínas en inyección, basado en su contenido de aminoácidos esenciales.

Este ensayo comprende varias etapas, las que se muestran en la Tabla 6.

**TABLA 6:
ETAPAS DE LA PRUEBA DE ADECUABILIDAD BIOLÓGICA**

ETAPA	DIETA	DURACION DIAS	EFEECTO
A	Dieta de depleción y agua	12	Pérdida de peso
B	Dieta de depleción control de nitrógeno suplementado en agua	3	Ganancia de peso
C	Dieta de depleción y agua	5	Pérdida de peso
D	Dieta de depleción y muestra bajo ensayo en agua	5	Ganancia de peso

Para los períodos de depleción y control, se emplea un grupo no menor de 6 ratas machos, de 2 a 4 meses de edad y de 190 a 255 g de peso, las que son seleccionadas y colocadas en cajas individuales. A los animales se les brinda libre acceso a agua y la dieta de depleción por 12 días. Como esta dieta es deficiente en nitrógeno total y en los requerimientos de aminoácidos esenciales de la rata, los animales pierden peso. Al final de este período, las ratas son pesadas y cualquier rata que pese más del 90% del peso inicial es descartada.

Toda el agua de beber es removida de las cajas, y por los siguientes tres días, una mezcla suplementada de nitrógeno control en agua es ofrecida a las ratas. Esta mezcla es administrada en cantidades equivalentes a 0,12 g de nitrógeno por rata por día, diluida a 20 mL y ofrecida al mismo tiempo cada mañana en un recipiente adecuado para prevenir derrames, o en un reservorio terminado en un tubo para beber. La dieta de depleción que es esencialmente libre de nitrógeno es continuada durante el período que los animales están recibiendo el suplemento de nitrógeno control. En el tercer día, cada rata es pesada individualmente. Los animales que no han consumido todo el suplemento de nitrógeno control son descartados.

Por los siguientes tres días el suplemento de nitrógeno control es reemplazado por agua y las ratas continúan con la dieta de depleción sin suplemento de nitrógeno. Las ratas son nuevamente pesadas y cualquiera que no hubiera perdido peso con relación al anterior pesaje, es descartada.

Para la prueba final, un grupo de no menos de 6 ratas que hayan completado el período de depleción y control es conformado. El peso de cada rata es determinado y registrado como el peso inicial. Las ratas son mantenidas por 5 días en la dieta de depleción con un suplemento diario de 20 mL de una solución conteniendo el hidrolizado proteico para inyección que se desea evaluar, en una cantidad equivalente a 0,12 g de nitrógeno, ofrecida cada mañana de la misma forma que fue ofrecido el suplemento de nitrógeno control. El agua es retirada dos horas antes y hasta 4 horas después de ofrecer el suplemento. Luego, si el suplemento ha sido consumido, el agua puede ser ofrecida *ad libitum*.

En la tarde del quinto día, cada rata es finalmente pesada y los pesos final e inicial son comparados. No más de una rata de un grupo de seis empleadas en la prueba o dos de un grupo de diez puede fallar en ganar o mantener su peso durante la prueba para que se considere que la preparación cumple los requerimientos de la USP.

<151> PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS

Las soluciones parenterales son oficialmente ensayadas para descartar la presencia de pirógenos, por una prueba biológica en la que se emplea como criterio de corte la respuesta febril de conejos inyectados por vía intravenosa con el material bajo ensayo. Esta prueba se tornó en método convencional de uso general en la década del 50, y se ha mantenido casi invariable en su metodología durante las últimas décadas. Se han desarrollado equipos electrónicos y/o computarizados que utilizan sensores (termocuplas) de gran sensibilidad y

precisión, que permiten registrar la temperatura de varios conejos simultáneamente (Figura 2). Sin embargo, el desarrollo progresivo de la prueba de LAL (Limulus amoebocyte Lisate) viene desplazando a la prueba de pirógenos de la farmacopea, a partir de la Edición XXII. En la Farmacopea XXIII, la mayoría de los productos inyectables deben cumplir con la prueba de LAL, y ya no requieren de la prueba de pirógenos. Mayores detalles sobre ambas pruebas son materia del Capítulo V de este libro.

La prueba de pirógenos es designada para productos que pueden ser tolerados por el conejo utilizado, en una dosis de 10 mL/kg, o para aquellos que requieren dilución o pH, isotonzados mediante la adición de cloruro de sodio libre de pirógenos. Las instrucciones específicas para cada producto se indican en las monografías respectivas.

Para el registro de la temperatura, se utiliza un dispositivo adecuado sensible a la temperatura (termómetro, o termocupla) el que ha sido ensayado previamente para determinar el tiempo de respuesta necesario para obtener la máxima lectura de temperatura. El dispositivo de registro se introduce dentro del recto del conejo a una profundidad no menor de 7,5 cm y por el tiempo suficiente para permitirle llegar a la máxima temperatura antes de efectuar la lectura.

Para la prueba se emplean conejos adultos sanos que han mantenido su peso durante 3 días consecutivos previos a la prueba bajo las condiciones ambientales especificadas para la prueba. Los conejos son colocados en jaulas individuales, en un área de temperatura uniforme ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y libre de disturbios ambientales que los exciten. Los conejos que hubieren sido utilizados en pruebas previas de pirógenos deberán tener un tiempo de reposo mínimo de 48 horas antes del reuso, si la prueba previa tuvo resultados conformes. Si la muestra previa fue pirogénica, el período de reposo debe ser prolongado a por lo menos 2 semanas. Para animales que van a ser empleados por primera vez, un período de ensayo simulado debe ser efectuado para lograr su acondicionamiento a la prueba. La inyección de material de prueba debe ser omitida en esta prueba simulada.

La prueba es conducida en un área separada de aquella donde los animales normalmente viven (bioterio) y bajo condiciones ambientales similares. El día de la prueba, se retiran todos los alimentos a los conejos hasta que se complete la prueba, manteniéndose el acceso al agua. La temperatura control es tomada a cada animal a utilizarse en el ensayo. Sólo se utilizan aquellos animales cuya temperatura control no difiera en más de 1°C de los otros. Cualquiera animal que tenga una temperatura mayor de $39,8^{\circ}\text{C}$ es excluido de la prueba.

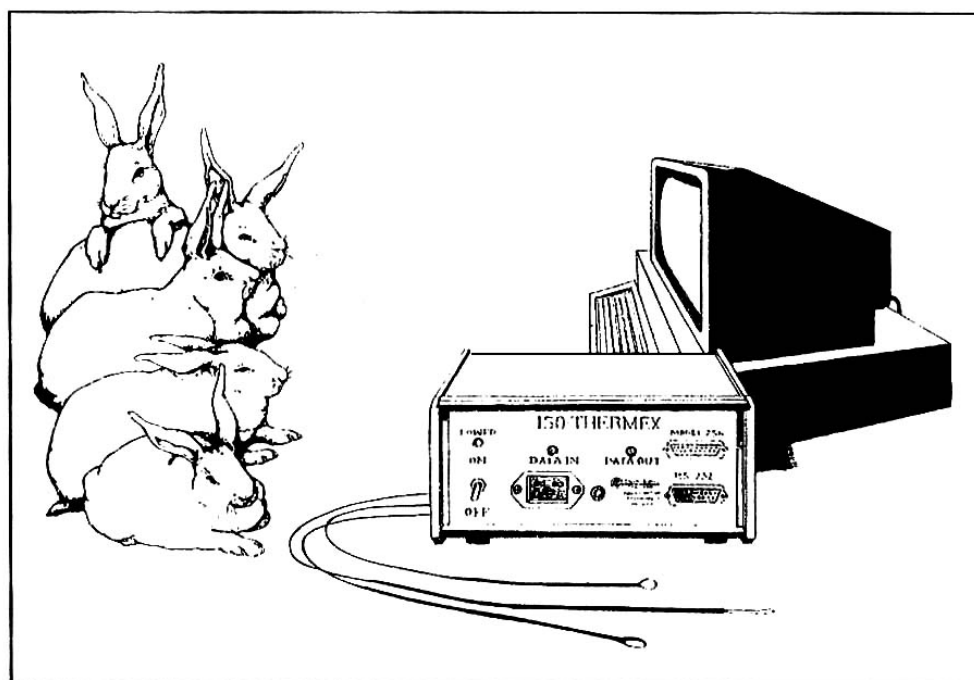


Figura 2 : Prueba de pirógenos automatizada

Las jeringas, agujas y material de vidrio empleado para la prueba debe ser apirogenizado por calentamiento previo a 250°C por no menos de 30 minutos, o por cualquier otro método adecuado. La muestra a

ser ensayada debe ser temperada a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, previa a su inyección al conejo.

Excepto cuando específicamente se indica otra temperatura, la muestra previamente temperada a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, es inyectada en la vena marginal de la oreja de tres conejos, 30 minutos después de haber tomado la temperatura control. Una dosis de 10 mL/kg de peso corporal es empleada, a menos que otra dosis sea indicada en la monografía del producto. La temperatura es luego determinada a las 1, 2 y 3 horas subsiguientes a la inyección.

La prueba es positiva si cada conejo muestra un incremento individual en la temperatura, de $0,6^{\circ}\text{C}$ o mayor, o si la suma de los incrementos de los tres conejos excede $1,4^{\circ}\text{C}$.

Si uno o dos conejos muestran un incremento individual en la temperatura, de $0,6^{\circ}\text{C}$ o mayor, ó si la suma de los incrementos de los tres conejos excede $1,4^{\circ}\text{C}$, la prueba debe ser repetida empleando otros 5 conejos adicionales. La prueba es positiva si 4 ó más de los 8 conejos muestran incrementos individuales en la temperatura, de $0,6^{\circ}\text{C}$ o mayor, o si la suma de los incrementos de los tres conejos excede $3,7^{\circ}\text{C}$.

<161> PRUEBAS REQUERIDAS POR LOS EQUIPOS DE TRANSFUSION E INFUSION

La Farmacopea XXIII incluye una relación de requerimientos aplicables a los artículos médicos que son etiquetados como no pirogénicos, y que entran en contacto directamente con el sistema cardiovascular, líquido cerebroespinal o sistema linfático. (USP XXIII, Suppl. 1 y 2).

Estos requerimientos incluyen las siguientes pruebas:

- Esterilidad
- LAL o Pirógenos
- Seguridad (Reactividad *in vitro*, Reactividad *in vivo*)
- Otros para contenedores.

Los siguientes materiales están obligados a cumplir con estos requerimientos:

- Equipos de administración de soluciones
- Equipos de extensión
- Equipos de transferencia
- Equipos de administración sanguínea
- Catéteres intravenosos
- Implantes
- Tubos y accesorios de oxigenación extracorpórea
- Dializadores y tubos de diálisis y accesorios
- Válvulas cardíacas
- Injertos vasculares
- Catéteres de liberación de drogas intramusculares
- Conectores para infusión y transfusión.

Los requerimientos no se aplican a los siguientes tipos de productos:

- Productos ortopédicos
- Guanles de látex
- Apósitos
- Vendajes
- Parches

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *The United States Pharmacopeial Convention.* (1994). The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. 2392 págs.
2. *The United States Pharmacopeial Convention.* (1994). Supplement 1. The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. pp: 2393 - 2594.
3. *The United States Pharmacopeial Convention.* (1995). Supplement 2. The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. pp: 2596 - 2850.
4. *The United States Pharmacopeial Convention.* (1995). Supplement 3. The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. pp: 2852 - 3101.
5. *The United States Pharmacopeial Convention.* (1995). Supplement 3. The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. pp: 2852 - 3101.
6. *The United States Pharmacopeial Conventionl.* (1996). Supplement 4. The United States Pharmacopeia USP23, The National Formulary NF18. Taunton, Rand McNally. pp: 3103 - 3342.

**ANEXO 1 :
SUMARIO DE PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS FARMACOLOGICOS**

Artículo Compendial	Actividad ensayada	Animal empleado	Ruta de administración del material de prueba	Punto final del ensayo	Unidades	Potencia	Pruebas biológicas adicionales requeridas
Digitalis	Acción cardiotónica	Cerdo	infusión i.v.	Arresto cardíaco (muerte)	100 mg es equivalente a no menos de 1 USP unidad de Digitalis	—	—
Insulina inyección	Hipoglicemizante	Conejo	Inyección s.c.	Reducción del nivel de glucosa sanguínea	1 ml es equivalente a 40, 100 ó 500 Unidades de Insulina USP	no menor de 95% ni mayor de 105% de lo declarado en el rotulado	Bioidentidad ¹
Globin zinc Insulina inyección	Hipoglicemizante	Conejo	Inyección s.c.	Reducción del nivel de glucosa sanguínea -	1 ml es equivalente a 40, o 100 U de Insulina USP	—	Bioidentidad
Isophane Insulina suspensión	Hipoglicemizante	Conejo	Inyección s.c.	Reducción del nivel de glucosa sanguínea -	1 ml es equivalente a 40, o 100 Unidades de Insulina USP	—	Bioidentidad

¹ Convulsiones después de inyección s.c. en conejos, recobrada rápidamente por inyección i.v. de glucosa

**ANEXO 1 :
SUMARIO DE PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS FARMACOLOGICOS (Continuación)**

Artículo Compendial	Actividad ensayada	Animal empleado	Ruta de administración del material de prueba	Punto final del ensayo	Unidades	Potencia	Pruebas biológicas adicionales requeridas
Glucagon para inyección	Hiperglicemizante	Gato hembra (2-4 kg) no grávido (inyectado i.p. con dextrosa 16 horas previas al ensayo)	Inyección i.v.	Elevación del nivel de glucosa en sangre.	—	no menor de 80% ni mayor de 120% de lo declarado en el rotulado	—
Oxitocina inyección	Actividad Vasodepresora en pollos jóvenes anestesiados (índice de actividad oclitócica)	Pollos jóvenes	Inyección i.v. de dosis sucesivas intermitentes randomizadas	Reducción de la presión arterial.	1 ml posee actividad oclitócica equivalente a 10 Unidades USP de Pituitaria Posterior	No menor de 85% ni mayor de 120% de lo declarado en el rotulado	Actividad presora ¹
Vasopresina inyección	Vasopresor	Ratas pretratadas con Fenoxibenzamina	Inyección i.v. de dosis sucesivas intermitentes randomizadas	Elevación de la presión arterial	1 ml posee actividad presora eq. a 20 U USP Pituitaria Post.	No < de 85% ni > de 120% de lo declarado	Actividad oclitócica ²

¹ Elevación de la presión arterial luego de la inyección i.v. de la muestra de ensayo, en ratas pretratadas con Fenoxibenzamina

² Contracción del músculo uterino aislado de cobayo

**ANEXO 1 :
SUMARIO DE PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS FARMACOLOGICOS (Continuación)**

Artículo Compendial	Actividad ensayada	Animal empleado	Ruta de administración del material de prueba	Punto final del ensayo	Unidades	Potencia	Pruebas biológicas adicionales requeridas
Pituitaria posterior en inyección	Vasodestructor y vasopresor	Refiérase a ensayos para oxitocina inyección (pollos jóvenes) y vasopresina inyección (Ratas pretratadas con Fenoxibenzamina)	Inyección i.v. de dosis sucesivas intermitentes randomizadas	Actividad oclitócica: Reducción de la presión arterial en pollos Actividad de vasopresina: Elevación de la presión arterial en rata pretratada	1 mL posee actividad equivalente a 10 U USP de actividad oclitócica de Pituitaria Posterior y 5 U USP de actividad de vasopresina de Pituitaria Posterior	No menor de 85% ni mayor de 120% de lo declarado en el rotulado	Actividad oclitócica ¹ Actividad presora ²
Corticotropina inyección Corticotropina inyección respiratoria	Estimulación de la corteza adrenal	Ratas hipofisectomizadas	Inyección s.c.	Reducción del contenido de ác. ascórbico en glándulas adrenales		No < de 85% ni > de 120% del declarado en el rotulado	Actividad de vasopresina ³

¹ El producto no debe contener excesiva actividad oclitócica determinada mediante contracción del músculo uterino aislado de cobayo.

² El producto no debe contener excesiva actividad vasopresora determinada mediante elevación de la presión arterial luego de la inyección i.v. de la muestra de ensayo, en ratas pretratadas con Fenoxibenzamina

³ Elevación de presión arterial en ratas pretratadas con fenoxibenzamina

**ANEXO 1 :
SUMARIO DE PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS FARMACOLOGICOS (Continuación)**

Artículo Compendial	Actividad ensayada	Animal empleado	Ruta de administración del material de prueba	Punto final del ensayo	Unidades	Potencia	Pruebas biológicas adicionales requeridas
Heparina cálcica Heparina cálcica para inyección	Anticoagulante	Carnero	In vitro, mediante adición de Heparina sódica a plasma sanguíneo	Inhibición de la formación de coágulo	1 mg es equivalente a no menos de 140 Unidades USP de Heparina	No menor de 90% ni mayor de 110% de lo declarado en el rotulado	Actividad antifactor Xa in vitro
Protamina sulfato Protamina sulfato inyección	Neutralización de Heparina	Carnero	In vitro. Se adiciona Protamina sulfato a plasma sanguíneo conteniendo cantidades conocidas de Heparina sódica.	Reducción del tiempo de coagulación de plasma heparinizado	1 mg neutraliza no menos de 100 Unidades USP de Heparina.	No menor de 90% ni mayor de 120% de lo declarado en el rotulado	—
Aceite de hígado de Bacalao	Antirraquitico (Vitamina D)	Ratas raquíticas	Alimentación vía oral. (la mitad de la dosis el día 1; la segunda mitad el día 3 ó 4)	Calcificación de las metafisis raquíticas del radio y tibia.	1 g contiene no menos de 2,125 ug (85 U USP) de vitamina D.	Vit. D. (1U USP=0,3 ug) Vit A (1U USP = 1 ug)	1 g contiene no menos de 255 ug (850 USP Unidades) de vitamina A (ensayada por el método espectrofotométrico)

CAPÍTULO II

DISEÑO E INTERPRETACION DE PRUEBAS EN ORGANOS AISLADOS Y ANIMALES INTACTOS

Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño

DISEÑO E INTERPRETACION DE PRUEBAS EN ORGANOS AISLADOS Y ANIMALES INTACTOS, INTRODUCCION AL BIODOSAJE

Dr. Ramiro Castro de la Mata

El control de calidad farmacológico en medicamentos está siendo reemplazado por control físico-químico. Así la USP XXI exigía un 11,29 de análisis farmacológicos, mientras que en la USP XXIII la cifra se ha reducido a menos del 1%. Esto no quiere decir que el ensayo farmacológico haya dejado de tener vigencia. Lo que ocurre es que cuando se tiene la seguridad que un análisis físico-químico es capaz de reemplazar al farmacológico es que se prefiere este último por su menor variabilidad y, usualmente, menor costo.

El laboratorio de Farmacología en sí tiene múltiples usos y debe pensarse en función de una utilización más amplia que el mero control de calidad, sobre todo en investigación y desarrollo.

Para las pruebas farmacológicas en control de calidad se usan animales; el uso de humanos está prácticamente proscrito en todas las Farmacopeas. Norteamérica eliminó incluso las pruebas de olor y sabor de preparados ya que esto podría exponer a las personas al contacto con sustancias tóxicas o a reacciones alérgicas. Debe tenerse en cuenta que los códigos de ética en investigación biomédica regulan de manera muy cuidadosa la participación de seres humanos y cuando lo hacen debe ser en condiciones estrictamente controladas y siguiendo las indicaciones precisas que toman en cuenta un cuidadoso balance de riesgo-beneficio.

En nuestro país, todavía se siguen prácticas ya abolidas en lugares más adelantados. Es así que Indecopi contempla una técnica en humanos para control de adhesivos con posible efecto irritante. Aquí se confunde lo que es desarrollo de un nuevo producto, en el cual es necesario hacer las pruebas en humanos, con el control de calidad de un compuesto que se ha demostrado que no es dañino, para ver si está bien preparado. En este caso no se justifica la utilización de humanos. En el laboratorio de Farmacología de la UPCH se lleva a cabo la prueba en conejos, al que se le depila un día anterior a la prueba. Se le inyecta solución de azul de Evans y coloca un esparadrapo o la muestra a analizar. Luego de un tiempo se observa la existencia de la mancha azul y su intensidad, lo que indicaría si es irritante o no y hasta qué punto.

Para la investigación farmacológica, no en el control de calidad, se puede hacer uso de voluntarios humanos, cuando sea necesario, siempre que se lleve a cabo estrictamente según las condiciones de los códigos de ética.

El uso de animales en las pruebas farmacológicas ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. Así antes se usaban animales grandes, ahora se hace uso con frecuencia de ratas y ratones, esto debido al desarrollo tecnológico ya que se cuenta con equipos más sofisticados y sensibles. Hasta hace muy pocos años, por ejemplo, era prácticamente imposible el registrar de manera confiable la presión arterial en una rata. Ahora se hace de rutina en cualquier laboratorio medianamente equipado.

Los animales pueden ser usados de diversas formas en las pruebas Farmacológicas:

- Animales intactos
- Organos in situ
- Organos aislados
- Células en cultivo
- Componentes sub-celulares

Cada ensayo requiere del procedimiento más apropiado para cumplir el objetivo propuesto. En términos generales el más usado es el de órganos aislados. El uso de células en cultivo está aumentando con el objeto de disminuir el empleo de animales, defendidos celosamente por las sociedades protectoras, y rebajar los costos de mantenimiento de viveros. Así, por ejemplo, la prueba de irritabilidad ocular que en muchos países aún se hace en animales intactos, en Norteamérica ya está siendo reemplazada por células en cultivo, esta técnica no está mayormente difundida entre nosotros ya que requiere de experiencia y de instalaciones especiales.

PRUEBAS FARMACOLOGICAS EN ORGANOS AISLADOS:

Cuando se trabaja en órganos aislados, se toma en consideración lo siguiente:

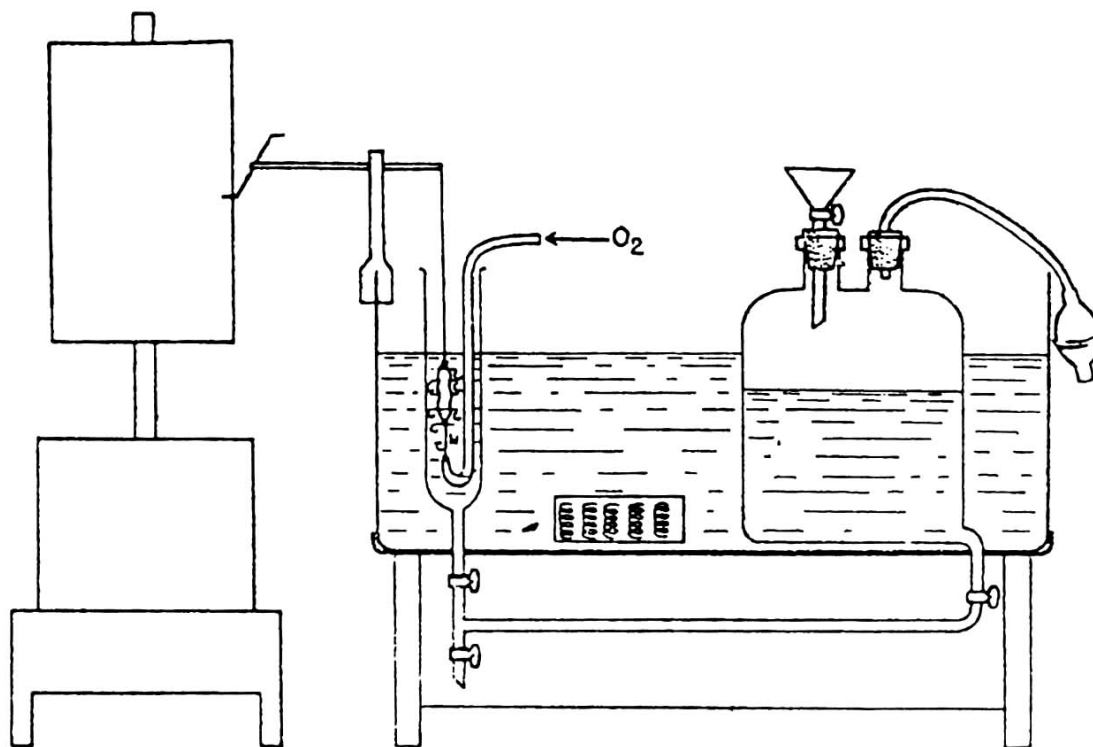


Fig. 1: Dispositivo experimental para el útero de cobayo, aislado, según Dale y Laidlaw. (De F. Guerra, 1946)

El Órgano.- El órgano puede ser corazón, porción del tejido intestinal (Ileón), útero, tráquea. etc. se usan de preferencia aquellos cuya actividad pueda registrarse por el desarrollo de movimiento o tensión, modificaciones de campo eléctrico o modificación del medio que lo rodea. Además hay que tener en cuenta cómo se regula su funcionamiento normal en el organismo intacto. Este puede ser por vía humoral, nerviosa, o por mecanismos propios del órgano.

Cuando se trabaja con órganos aislados se determina con precisión la acción directa de las drogas eliminándose los mecanismos homeostáticos.

Temperatura.- Se trabaja generalmente con la temperatura normal del organismo, aunque a menudo se manipula para obtener mejores resultados. Si bien la temperatura óptima de funcionamiento es la temperatura más próxima a la del cuerpo, la temperatura del ensayo no necesariamente es igual a la temperatura óptima de funcionamiento del organismo. Es frecuente, por ejemplo, que uno quiera medir la contractilidad uterina por efecto de las drogas. En este caso la motilidad espontánea interfiere con los resultados pero puede eliminarse trabajando a temperaturas más bajas.

Líquido que rodea al órgano.- Se usan soluciones isotónicas que deben contener sales iguales a las del medio interno. Sin embargo, cada órgano tiene requerimientos especiales para el tipo de ensayo que se va a hacer. El nombre genérico de las soluciones es el de Soluciones Ringer, y cada una de ellas tiene usualmente el nombre de su autor. Es así que en los manuales se encuentran las fórmulas de Jalón, Tyrode, Krebs, etc.

Oxígeno.- En la mayoría de los casos se debe proveer de 95% de oxígeno y 5% de bióxido de carbono, en otros es necesario el uso de oxígeno puro. En otros casos aire ambiental. A veces esto puede ser crítico para los efectos farmacológicos por lo que hay que hacer siempre una evaluación previa.

Equipo.- Existen diversos equipos: los hay muy simples como los hechos en forma artesanal utilizando elementos que se pueden encontrar en cualquier lugar y los complejos que son fabricados por talleres especializados, usualmente de un costo muy elevado en relación a su diseño y materiales. El registro de la actividad mecánica del órgano aislado puede hacerse en un kimógrafo o Polígrafo, según el equipo usado.

Existen sistemas cerrados y abiertos, pero todos constan de un recipiente para mantener al órgano y un sistema para mantener constante la temperatura, sea mediante el uso de un recipiente mayor que se calienta directamente, sea utilizando uno de doble pared por donde circula el agua temperada por un termostato.

Registro de actividad mecánica: El sistema usado puede ser isotónico, isométrico o auxotónico, según los requerimientos del caso. Tratándose de registro en quimógrafo es conveniente siempre usar inscriptores frontales para poder hacer con precisión las mediciones y definir, sin correcciones, la forma de las curvas. De otro lado, también debe tenerse en cuenta en estos casos el problema de la fricción entre el inscriptor y el papel ahumado que dificulta o impide en algunos casos el registro. La solución es fácil y consiste en mantener una vibración constante del sistema de registro.

PRUEBAS EN ANIMAL INTACTO

Las pruebas pueden hacerse por observación directa o por medio de instrumentos. Se puede emplear para el estudio del Sistema nervioso central (sustancias estimulantes y sustancias depresoras), Agresividad del animal (sustancias tranquilizantes). Actividad sexual, Analgesia, Dependencia, irritabilidad ocular, irritabilidad cutánea, broncoconstricción, presión arterial, etc. En estos casos se aprecian los mecanismos de regulación, que se pueden disminuir o anular mediante procedimientos quirúrgicos o farmacológicos.

BIBLIOGRAFIA

1. *Finney, D.J.*; (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. Hafner Publishing Co. New York.
2. *Staff the Department of Pharmacology, University of Edimburg*. (1968). *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations* E. & S. Livingstone Ltd. Edimburg.

CAPÍTULO III

INTRODUCCION AL BIODOSAJE

Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño

INTRODUCCION AL BIODOSAJE

Dr. Ramiro Castro de la Mata

Para realizar un biodosaje primero es indispensable definir el efecto que se quiere controlar y buscar los números que lo representen. Es decir definir primero el parámetro farmacológico, y luego aplicar los métodos numéricos estadísticos.

Para el biodosaje se tiene:

Estándar.- el cual es una sustancia conocida

Sustancia problema.- es la sustancia a analizar

El análisis consiste en obtener una curva dosis-respuesta para el estándar y ver si el problema sigue esta curva. Es decir primero hay que ver si la respuesta que se ha definido y cuya magnitud se puede representar por un número, guarda alguna relación con la dosis administrada o su equivalente como concentración en el baño de órganos aislados y en que forma, es decir obtener la ecuación de la curva dosis-respuesta.

Para la mayoría de los casos las dosis se incrementan por intervalo logarítmico, es decir, cada dosis se multiplica por un factor, ya que esto da con más seguridad una respuesta lineal. Como ejemplo: Si con una dosis como 1 obtenemos una respuesta de 5 y con una dosis como 2 obtenemos una respuesta de 6, para obtener una respuesta de 7 debemos usar una dosis como 4. Las dosis van creciendo por un factor de 2 y las repuestas aumentan de uno en uno. Si en vez de usar un número usamos el logaritmo de este número entonces la diferencia entre el logaritmo de la primera y segunda es igual al logaritmo del factor, esto es el logaritmo de la dosis anterior más el logaritmo del intervalo. De esta manera si se colocan los datos en el gráfico se obtiene una línea recta.

Determinada la curva dosis-respuesta del estándar es fácil apreciar que al obtenerse una respuesta determinada, ésta corresponde a una dosis que se puede calcular con facilidad desde la propia gráfica o de la ecuación de la curva. Sin embargo hay diversos factores que hacen que el procedimiento sea un poco más complicado. Es así que hay que asegurarse que el estándar y el problema den una respuesta lineal con el logaritmo de la dosis, que la sustancia problema de una curva igual o paralela a la del estándar. Que si hay curvatura ésta sea despreciable y que no haya diferencia de curvaturas entre el problema y el estándar.

Durante muchos años la definición de las curvas, la medida de su variabilidad y sus desviaciones de la ecuación teórica constituyeron un problema por lo engorroso de los cálculos que podían tomar largas horas con las máquinas calculadoras. Es por ello que se diseñaron procedimientos simplificados empleando sólo dos o tres dosis para el estándar y para el problema de tal manera de poder emplear coeficientes polinomiales en los llamados análisis a 4 ó 6 puntos. Esto si bien permitía simplificar los cálculos espantaba a los farmacólogos poco afectos a las complicaciones matemáticas.

El desarrollo de la computación permite ahora hacer los cálculos y obtener resultados mucho más precisos y confiables en unos pocos minutos a condición de seguir instrucciones sencillas que se muestran en la pantalla del computador.

Para la determinación de la forma de la curva dosis respuesta tenemos dos aproximaciones:

- *Las ecuaciones empíricas:*

En este caso se determinan pares de valores es decir valor de la dosis y de su efecto (valores x, y). Luego se pueden poner los puntos en papel cuadrulado y se debe ver “al ojo” la línea que mejor los represente. Se pueden hacer diversas transformaciones de los valores buscando en qué caso los puntos se presentan más cerca de una línea recta. Como hemos dicho más arriba, en la mayoría de casos la relación es lineal cuando se representa el logaritmo de la dosis contra la respuesta. Con el procedimiento de mínimos cuadrados se determina la ecuación correspondiente.

Si trabajamos por ejemplo con órganos aislados añadiendo Acetilcolina a dosis crecientes, con intervalo logarítmico nos encontramos que se va a dar una curva de tipo sigmoideal alargada. Si se toma la porción media de la curva, ésta se asemeja a una línea. Esta parte recta permite el biodosaje.

- *Las consideraciones teóricas:*

La forma sigmoideal de la curva se puede explicar mediante la teoría de receptores, donde se asume que el efecto de una droga es proporcional al complejo que se forma entre la droga y el receptor:

$$E = \alpha RA$$

La droga al unirse con su receptor da lugar a un complejo reversible.

Se plantea que:

$$[Rt] = [R] + [RA]$$

Siendo [Rt] = Receptores totales, [R] = Receptores libres, [RA] = Receptores unidos a la droga A.

Se puede calcular:

$$Ea = \frac{\alpha Rt [A]}{[A] + Ka}$$

Si se considera $Rt = 1$

$$Ea = \frac{\alpha [A]}{[A] + Ka}$$

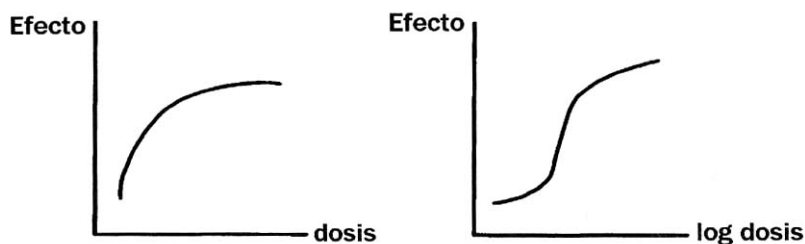
- Ea = Efecto a la droga
- [A] = Concentración de la droga
- Ka = Constante de disociación entre droga-receptor
- A = Eficacia intrínseca de la droga

Si Ka es muy grande se necesitará una mayor dosis para producir efecto.

En general para un mismo efecto mientras mayor sea el valor de Ka necesitará mayor dosis de droga. Es por eso que se ha definido el concepto de “afinidad” como la inversa de Ka.

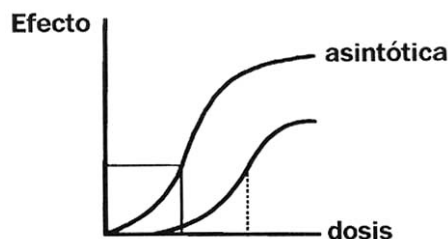
$$Ka = \frac{1}{\text{afinidad}}$$

Si usamos los conceptos indicados y llevamos a la gráfica los datos de dosis-efecto obtenemos:

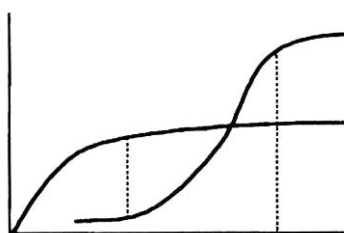


Existe coincidencia entre los datos experimentales y el planteamiento teórico. Vemos que la curva se hace sigmoideal y que se puede acercar a una línea recta si se usa el logaritmo de la dosis.

En el siguiente gráfico donde se comparan dos drogas se observa que usando diferentes dosis se puede obtener la misma potencia si definimos la potencia como la capacidad de producir un efecto máximo mayor o menor.



Si la eficacia intrínseca de la droga varía manteniéndose la misma afinidad se obtiene la curva:



La ecuación de la curva que resulta de la teoría de receptores corresponde a una Hipérbola de tipo B. Cuando se usa biodosaje esta fórmula no se emplea, ya que representa no sólo la parte recta sino también sus inflexiones y la log-dosis, en base a datos de la parte recta, resulta más adecuada.

En la Tabla 1 se puede observar las ecuaciones empíricas ajustadas para diferentes curvas. EB de b (de la pendiente) es más pequeño para log-dosis, la varianza xy viene a ser la separación entre los puntos individuales y la curva que los representa. Para log-dosis en este ejemplo sería la más segura ya que toma un valor cero.

Regresión y Correlación

La regresión y la correlación tienen significados diferentes ya que se refieren a problemas diferentes aunque en muchos casos no se interpreta bien su significado. Correlación toma valores que se distribuyen al azar y para los cuales se quiere ver si de alguna manera están relacionados unos con otros. Se busca sólo ver si están relacionados, sin asumirse, porque la operación matemática no lo justifica, nada acerca de que uno sea causa del otro. La regresión en cambio, asume una causalidad definida, conocida, o por lo menos que dos fenómenos obedecen a una causa común de tal manera de poder predecir un valor si se conoce el otro.

Cuando se trabaja con la correlación, que se define el valor R el cual va de 1 a -1, el valor 0 indica que no hay ninguna relación entre los valores estudiados. El valor 1 indica que los valores están perfectamente asociados entre sí y que si uno de ellos crece en una determinada proporción, el otro lo hará en la misma; mientras que -1 es correlación inversa, mientras uno crece, el otro disminuye. Cuanto más se aleje de cero el valor la correlación es más significativa. Valores altos de correlación hacen suponer fenómenos de causalidad y se justifica (con reservas) el buscar la regresión.

En la regresión, se busca una fórmula que permita, conocido el valor de una variable, predecir el de la otra. En resumen, para el biodosaje se debe tratar de buscar:

- La mejor ecuación que se ajuste a nuestros datos (ecuación empírica).
- Establecer una línea recta mediante las transformaciones numéricas más adecuadas.
- Establecer diferencia entre curvas (curva transformada en línea recta), calculando la distancia horizontal que da la potencia relativa, por ejemplo: Cuántos gramos de una droga se necesitan

para producir el efecto de tantos gramos de la otra.

El problema resulta muy sencillo utilizando los programas correspondientes en la computadora. (Ver las instrucciones que acompañan al disquete correspondiente).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. *Finney, D.J.*; (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. Hafner Publishing Co. New York.
2. *Staff the Departament of Pharmacology, University of Edimburg*. E (1968). *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations* E. & S. Livingstone Ltd. Edimburg.
3. *Whittermbury, G. y Whittermbury, J.* (1957). *Ecuaciones Empíricas (Ejemplos Biológicos)*. Anales de la Facultad de Medicina de Lima, 40:315-437.

Tabla 1
ECUACIONES EMPIRICAS AJUSTADAS PARA
DIFERENTES CURVAS

Curva	Ecuación	EB de b	Varianza XY
Log-dosis	$Y = 1.0000 + 3.3219\% \log x$	0.0013	0.0000
Parábola	$Y = -.0215\% X^2 + 0.6129X + 0.6667$	0.0387	
Hipérbola B	$Y = x/(0.1285\% X + 0.8470)$	0.0362	0.0748
Potencias	$Y = 1.1914\% x^{0.5644}$	0.0731	0.1513
Recta	$Y = 1.5000 + 0.2419\%X$	0.6558	0.2581
Hipérbola D	$Y = 4.5000 + \% -3.8710\%1/X$	0.6558	0.2581
Semi log	$Y = 1.5194\% e^{0.0870\% X}$	0.4043	0.6654
Hipérbola C	$Y = 1 / (0.6910 + \%.378\% X)$	0.2636	9.4296

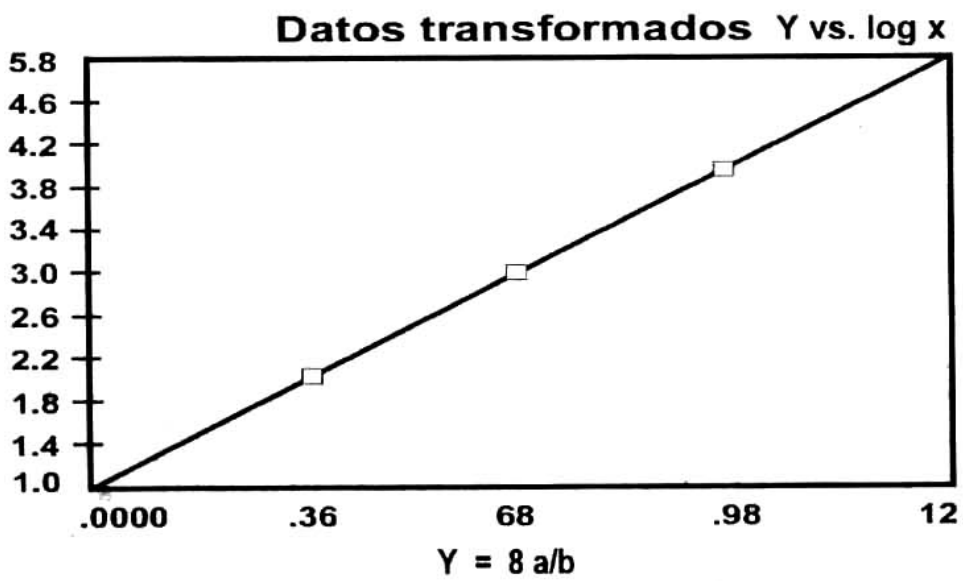
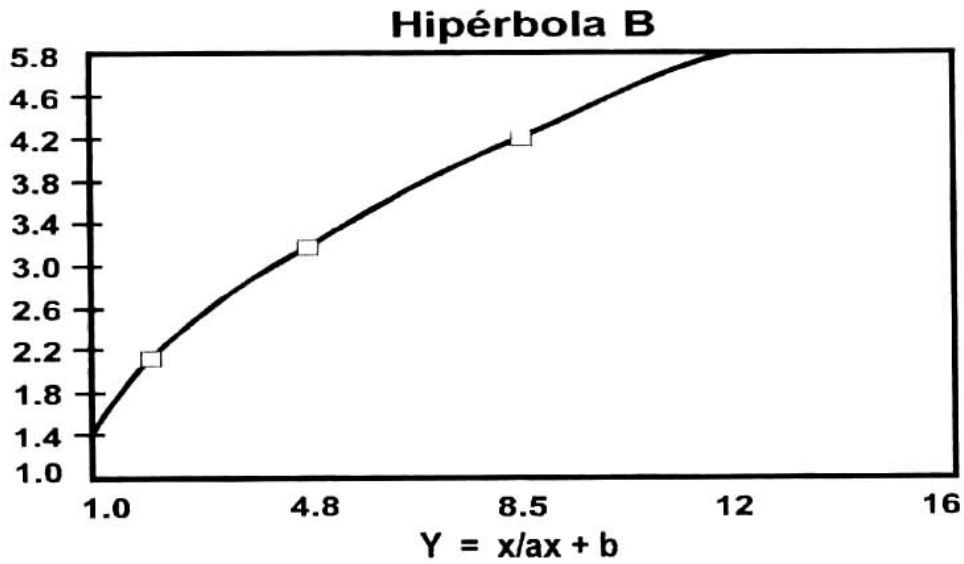
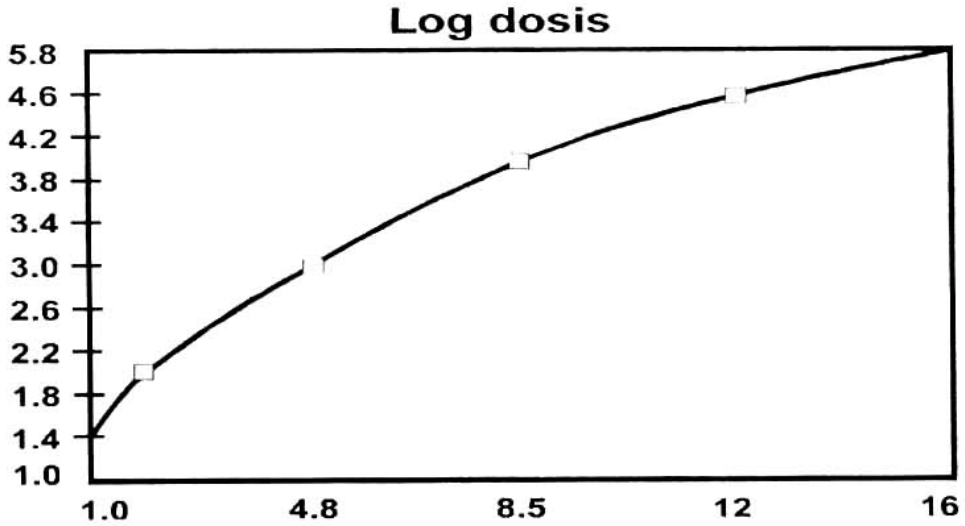
Para Gráfica B, Revisión R,
Si se quiere la correlación A

Nueva curva

Terminar T

r log dosis	=	1.00000	Es de r	=	0.000345
r Hipérbola B	=	0.99531	Es de r	=	0.055864
r potencias	=	0.97331	Es de r	=	0.132508
r lineal	=	0.93326	Es de r	=	0.207390
r Hipérbola D	=	-0.93326	Es de r	=	0.207390
r semi log	=	0.83458	Es de r	=	0.318052
r Hipérbola C	=	-0.71057	Es de r	=	0.406237

* Tomada de la pantalla de la computadora donde el programa ha calculado los diversos valores que se obtienen al ajustar los datos obtenidos a curvas hipotéticas, para una misma serie de datos experimentales.



Gráficos de Log dosis, Hipérbola B y Datos transformados Y vs. log x

CAPÍTULO IV

TOXICIDAD: DISEÑOS EXPERIMENTALES Y APLICACION DE PROGRAMAS ESTADISTICOS COMPUTARIZADOS

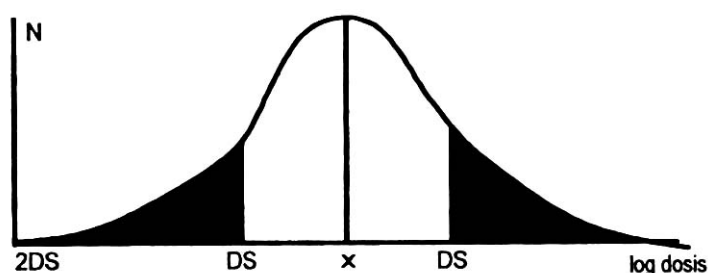
Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño

TOXICIDAD: DISEÑOS EXPERIMENTALES Y APLICACION DE PROGRAMAS ESTADISTICOS COMPUTARIZADOS

Dr. Ramiro Castro de la Mata Caamaño

La toxicidad debe poder expresarse mediante un dato numérico que permita hacer comparaciones entre diversos compuestos. La toxicidad siempre es expresada por kg de peso para disminuir la variabilidad debida al volumen de distribución de la droga.

Si se diseña un experimento que permita inyectar a un grupo de animales una droga en estudio hasta producir la muerte, se puede determinar cómo responde cada animal individualmente, es decir que el animal número uno necesitó determinada dosis, el número dos, otra; y así sucesivamente. Si llevamos los datos a la gráfica, usando el logaritmo de la dosis se obtiene una curva de distribución normal la cual es más frecuente en fenómenos biológicos:



Los parámetros de esta curva de distribución normal son:

Promedio.- que se obtiene a partir del punto máximo, punto donde las áreas bajo la curva son iguales a uno y otro lado, donde la media, la mediana y la moda son iguales, donde su derivada es igual a cero.

Desviación estándar.- Es la distancia en la abscisa, a uno u otro lado, que corresponde al momento en el que la curva cambia de dirección, al punto de inflexión de la curva donde la pendiente es máxima y la segunda derivada cero.

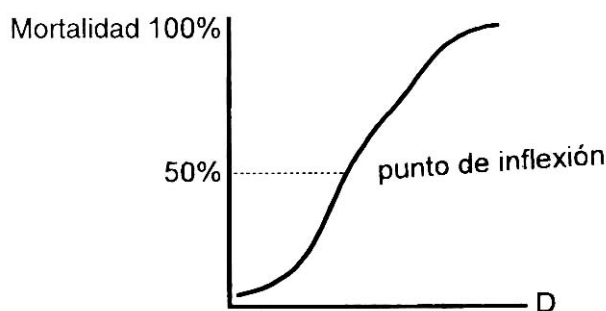
En este caso podemos definir con exactitud la toxicidad de la droga usando los parámetros de la curva normal, pero en la práctica es muy difícil y costoso hacer este tipo de determinaciones, a veces imposible, cuando la toxicidad se presenta después de un tiempo de la administración. Es por ello que se prefiere inyectar dosis definidas previamente a grupos de animales y determinar el porcentaje de muertos para cada dosis, a un tiempo definido que puede ser de 24, 48 ó más horas.

Vamos a suponer que la dosis letal encontrada mediante la determinación individual nos dio un promedio igual al logaritmo de 4 con una desviación estándar igual al logaritmo de 2. Si se inyecta la dosis 4 a un número grande de animales se morirá el 50% de ellos, ya que de acuerdo a la distribución normal el 50% de la población requerirá una dosis mayor y el otro 50% una menor, para la mitad la dosis no es suficiente y sobreviven, para la otra mitad es suficiente o excesiva y se morirán. Si se aplica la dosis 2 que coincide con la desviación estándar se morirá el 16% de la población. Esto lo podemos predecir ya que el área bajo la curva normal que corresponde al promedio menos una desviación estándar es 16% (aproximado). Si inyectamos otras dosis la mortalidad será de acuerdo al área bajo la curva normal obteniéndose una curva sigmoideal lo que sería igual a la mortalidad acumulada, a la integral de la curva normal.

Para cada mortalidad, puede calcularse un equivalente en distribución normal. En nuestro ejemplo la mortalidad de 16% corresponde al promedio menos una distribución normal, una mortalidad de 84% al promedio más una distribución normal. Los equivalentes en distribución normal se llaman NORMITS. Por definición el log de la dosis es lineal con el normit correspondiente que es su equivalente, cuando se usa como unidad de medida. En nuestro ejemplo (no olvidar que trabajamos con intervalos logarítmicos) la dosis de 1 corresponde al normit -2, la de 2 a -1 la de 4 a 0 (promedio), la de 8 a 1, 16 a 2, etc. Cuando se suma 5 al Normit se obtiene el PROBIT. (Esto se hace para no trabajar con números negativos).

El método de Probits se emplea para encontrar la mortalidad que produce una droga, Esta mortalidad sigue la curva sigmoideal con el logaritmo de la dosis pero el probit que corresponde a cada mortalidad es lineal con dicho logaritmo.

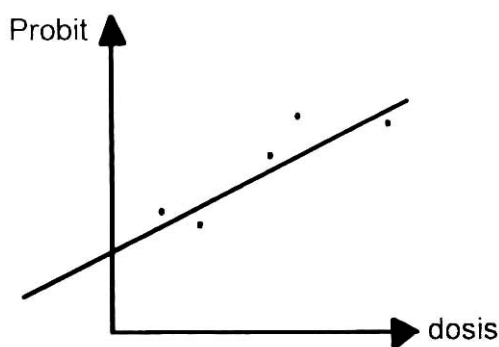
Si se examina la forma de la curva teórica puede apreciarse que no es propio hablar de una dosis tóxica o letal que mate al 100% de los animales, porque siempre habrá alguno, que teóricamente necesite una dosis mayor. Tampoco puede hablarse de una dosis suficientemente baja que no produzca mortalidad. Es por ello que se ha elegido como parámetro de definición de toxicidad la que corresponde al 50%. Es así que se define la Dosis Letal 50 (DL50), es la dosis que mata el 50% de población.



Siempre que se tenga que comparar la toxicidad de dos drogas se hace una transformación en probits. Luego trabajando con el Método de mínimos cuadrados y con probits se puede encontrar no sólo la DL50 sino también, como medida de variabilidad el Error estándar (ES). El procedimiento no es sencillo: Se toman grupos de por lo menos seis animales a los que se les inyecta a cada grupo una dosis de la droga, cuidando de separarlas por intervalos logarítmicos. Hay que encontrar primero una dosis que no mate a ninguno de los de su grupo y una que los mate a todos. Conocidas estas dosis se intrapolan 5 ó 6 grupos con intervalo logarítmicos constantes y se anota el número de muertos en cada caso. En las tablas se puede ver el probit que corresponde a cada mortalidad, el que viene a ser el llamado Probit Empírico.

Dado que los probits hallados casi nunca están estrictamente sobre una línea recta se calculan, por método gráfico en el papel o calculando por el método de mínimos cuadrados los probits que corresponden, estrictamente sobre la línea a cada una de las dosis empleadas. Estos son los Probits Provisionales.

Así en la curva dosis-probits:



Dado que en la curva el punto medio tiene mayor información que los extremos, en base al probit provisional se encuentra al probit de trabajo, para esto, cada probit provisional se multiplica por una serie de factores que dependen del porcentaje de alejamiento del punto medio y del número de animales empleado.

Con el método de mínimos cuadrados se obtiene el probit definitivo y con el probit definitivo se obtiene la DL50, que es la dosis a la que le corresponde un probit de 5.

Siempre hay que tener idea de la precisión de la medida, ya que si los datos están muy dispersos la medida central puede no tener valor. De otro lado hay que comparar los probits definitivos con los probits provisionales: si están muy diferentes hay que repetir el proceso usando los definitivos como provisionales.

Es así que trabajando con probits y el método de mínimo cuadrados se encuentra:

$$DL50 + ES$$

El error no va en relación con la dosis sino Log dosis, esto es:

$$\text{Log } DL50 + ES$$

Si se dice que la DL50 es: 30 mg/Kg \pm 7, se está expresando mal ya que indicaría que el 95% de los casos está entre 16 y 44 (30 \pm 14), por ello la forma correcta de expresar es:

DL50 es 30 mg/Kg con límites de confianza al 95% de 20 y 35.

El método de probits puede llevar a un cálculo de varias horas con muchas posibilidades de error, sobre todo si se trabaja con 5 decimales en los logaritmos. Ello dio lugar a que se pusieran en boga métodos gráficos aproximados como el de Reed y Muench. Las computadoras han facilitado enormemente el cálculo, hay que introducir solamente las dosis, el número de animales en cada caso y el número de muertos en cada grupo. En pocos segundos se obtienen los resultados que se pueden graficar. La iteración, de ser necesaria, toma unos cuantos segundos más.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Finney. D.J.*; (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. Hafner Publishing Co. New York.
2. *Gilman. A.C.; Rall, T.W; Nies, A.S. y P Taylor Goodman y Gilman.* (1991). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 8va. edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
3. *Whittembury. G. y Whittembury. J.* (1957). *Ecuaciones Empíricas (Ejemplos Biológicos)*. Anales de la Facultad de Medicina de Lima, 40:315-437.
4. *Staff of the Department of Pharmacology, University of Edimburg.* (1968). *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations* E. & S. Livingstone Ltd. Edimburg.
5. *Guerra P.C., F.* (1946). *Métodos en Farmacología Experimental*. Editorial Hispano Americana (UTEHA), México.
6. *Hardman. J.G.; Limbird. L.E.; Molinope. P.B.; Ruddon. R.W. y A.G. Gilman Soodman & Gilmans.* *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. Mc. Graw-Hill, New York, 1996.

CAPÍTULO V

PIROGENOS Y ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (LAL) EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

MSc. María Salas Arruz

PIROGENOS Y ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (LAL) EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

MSc. María Salas Arruz

Los pirógenos son sustancias que inducen fiebre en el hombre y otros mamíferos. La palabra “pirógeno” deriva del griego *pyro* que significa fuego.

Uno de los métodos oficiales en las Farmacopeas es la prueba de Pirógenos en conejos, que actualmente esta siendo reemplazado en la mayoría de casos por la prueba de Endotoxinas Bacterianas que se realiza empleando el **Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL)**.

Existen dos clases de pirógenos:

- Exógenos.**- Son sustancias originadas fuera del cuerpo y que inducen aumento de la temperatura cuando son inyectados a humanos y animales. Los lipopolisacáridos (endotoxinas) son los pirógenos exógenos más importantes sin embargo, existen otros de diversa estructura química. Los pirógenos exógenos incluyen: microbios, componentes microbianos de bacterias gramnegativas, grampositivas, virus y hongos.
- Endógenos.**- Producidos internamente por el hospedador en respuesta al estímulo de pirógenos exógenos. Son mediadores primarios de la fiebre.

Las fuentes de pirógenos más comunes son:

- Contaminación del agua.
- Sustancias en el proceso de producción que favorecen el desarrollo de gérmenes.
- Deficiente lavado y secado de envases, recipientes, aparatos de transfusión, jeringas, etc.
- Generadores de partículas: En el Cuadro 1, se describen las fuentes de generadores de partículas que podrían facilitar la contaminación con endotoxinas en los procesos de producción.
- El personal puede transportar bacterias y partículas en diferentes proporciones (Ver Figura 1).

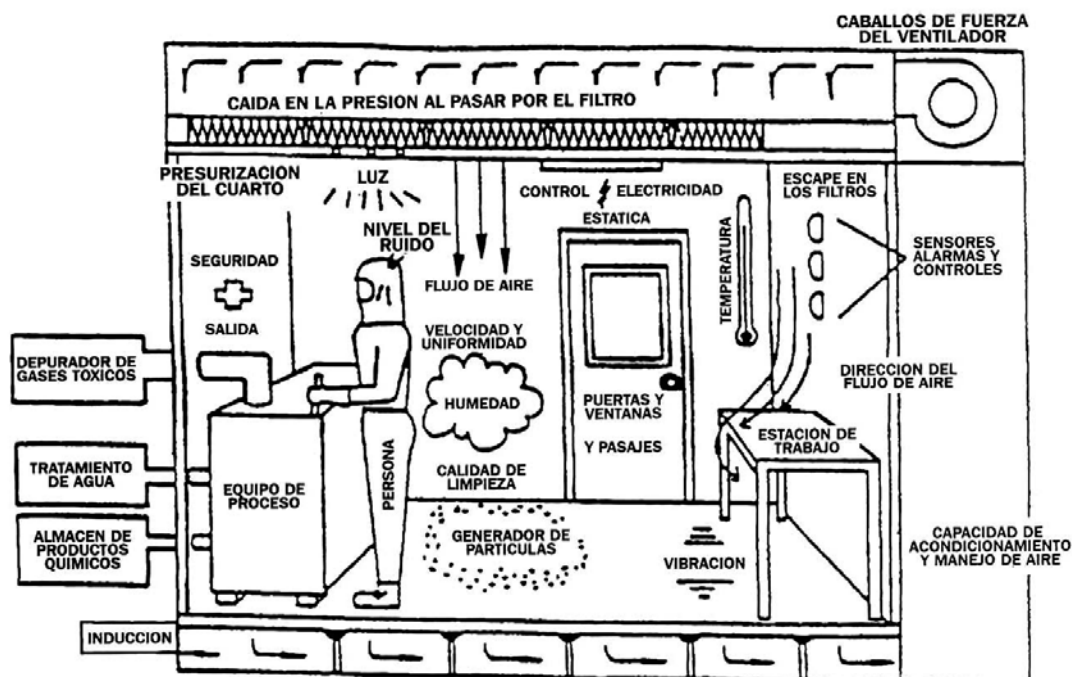


Figura 1 : Consideraciones de diseño de un cuarto estéril

**PRUEBA DE PIRÓGENOS:
USP XXIII <151> Pág. 1718**

La prueba de Pirógenos fue introducida en la Farmacopea de Estados Unidos en 1942 y fue diseñada para delimitar un nivel de riesgo aceptable de reacciones febriles en los pacientes a quienes se les administra una inyección.

Emplea al conejo como modelo experimental. La prueba consiste en medir el incremento de la temperatura rectal en el conejo, luego de la administración por vía intravenosa de la solución de prueba y esta diseñada para productos que puedan ser tolerados por el conejo en dosis que no excedan de 10 ml/Kg inyectado intravenosamente dentro de un período que no exceda los 10 minutos.

Actualmente la prueba de pirógenos ha sido automatizada mediante el empleo de diversos modelos de termocuplas brindando alta precisión y sensibilidad de las medidas y un software que facilita la captura de datos y los cálculos estadísticos.

**ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS:
TÉCNICA DE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL)-GEL CLOT
USP XXIII < 85 > PÁG. 1696**

Es una prueba para determinar la concentración de endotoxinas bacterianas que pueden estar presentes en la muestra. Se basa en la propiedad que tiene la endotoxina de inducir la coagulación de lisado de amebocitos del *Limulus polyphemus* o “cangrejo herradura”.

La prueba de Endotoxinas Bacterianas por la técnica de Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Gel Clot responde a las siguientes preguntas:

- ¿Tiene Endotoxinas... ¿Cuánto?
- ¿Sobrepasa el límite o especificación?
- ¿Es válida la Técnica para el tipo de producto a evaluar; inhibe o magnifica la reacción?
¿Hasta que dilución?

**PROCEDIMIENTOS Y RECOMENDACIONES PARA LA
DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS POR LA
TÉCNICA DE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL) - GEL CLOT**

1. Reactivos

- Lisado del Limulus Amebocyte (nombre comercial: Pyrotell)
- Agua apirógena
- Control Estándar de Endotoxinas (CSE) de Escherichia Coli.
- Buffer

2. Preparación del Material

- a. Apirogenizar a 250°C x 30 minutos ó 180°C x 3 horas:
 - material de vidrio
 - tijeras
 - pinzas
 - pipetas
 - papel aluminio
 - tubos

- b. Autoclavar:
 - material plástico: (tips nuevos)
- c. Trabajar de preferencia en Campana de flujo laminar

3. Verificación del pH

La mezcla de reacción del producto y del reactivo Pyrotell debe realizarse en el rango de pH de 6 a 8, por lo que se recomienda evaluar el pH de la reacción en forma indirecta, midiendo previamente el pH del producto a evaluar. Se procede en el siguiente orden:

- a. Si la muestra es líquida medir el pH tal cual. Si es sólida disolver en agua neutra y proceder con la medición.
- b. Si el pH de la muestra del producto a evaluar está en el rango de 6 a 8, el reactivo Pyrotell se puede disolver en agua apirógenica, y si esta fuera del rango disolver el reactivo en buffer.

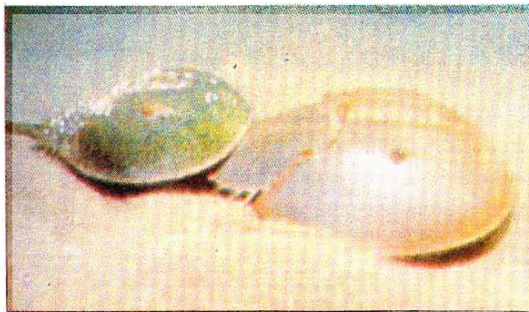


Foto 1 :
Cangrejo de herradura
Limulus polyphemus

Foto 2 :
Extracción de la
hemolinfa de los
Limulus en el proceso
de fabricación del
reactivo de LAL
(Associates of Cape
Cod, Inc, USA)



Foto 3 :
Reactivos para la prueba de LAL gel
clot (Associates of Cape Cod, Inc,
USA)

Fotos del catálogo de Associates of Cape Cod, Inc. USA.

El buffer además de servir como amortiguador de la reacción tiene como objetivo aproximar en lo posible la mezcla de reacción al rango de pH óptimo.

Se recomienda para algunos casos emplear el buffer con indicador, de manera que cuando la mezcla de reacción se encuentra fuera del rango esta vira de color, en cuyo caso es necesario soluciones de NaOH o HCl apirógenicas según convenga para ajustar el pH de la muestra previamente.

4. Disolución del reactivo

Se verifica si se ha elegido la sensibilidad de reactivo apropiada y el volumen en que se debe diluir.

Disolver el reactivo en agua apirógena o buffer, con movimientos giratorios suaves.

Si el reactivo se guarda disuelto se debe refrigerar de 2 a 8 grados centígrados.

5. Confirmación de la sensibilidad

A la sensibilidad del reactivo se le denomina Lambda “ λ ” y se expresa en Unidades de Endotoxinas por mililitros (UE/mL).

La confirmación de la sensibilidad consiste en verificar si el reactivo Pyrotell tiene la sensibilidad etiquetada y/o se encuentra dentro de los rangos aceptables (0,5 a 2 lambda).

Por ejemplo, si el reactivo esta etiquetado con sensibilidad 0,25 EU/ml, será dado por válido si la sensibilidad se encuentra entre 0,125 a 0,5 EU/ ml

La confirmación de la sensibilidad se realiza en base a la concentración del Control Estándar de Endotoxinas (CSE) de *E. coli* según certificado de análisis. En este certificado debe figurar el mismo lote de reactivo Pyrotell que se va a evaluar y el lote del CSE que se va emplear.

Se procede en el siguiente orden:

a. Disolución del CSE.

El CSE se disuelve en 5 mL y se mezcla por 10 minutos usando un agitador de tubos y luego se procede a preparar por lo menos 2 mL de las siguientes concentraciones en base a la concentración del CSE:

2 λ

1 λ

0,5 λ

0,25 λ ,

siendo lambda (λ) la sensibilidad etiquetada

NOTA: Si se trabaja con un CSE diluido en días previos, se puede agitar por menor tiempo (3 minutos).

Se recomienda tener formatos preestablecidos para las diluciones a efectuar a fin de evitar errores y en los cuales se considere una dilución adicional la cual se empleará más adelante como Spike.

La dilución Spike, es una solución de endotoxinas que tiene una concentración tal que, cuando se agregue 10 μ L de esta dilución a la muestra esta tenga una concentración final de 2 lambda/mL, siendo lambda (λ) la sensibilidad del reactivo.

Por ejemplo, si se va a usar un reactivo Pyrotell de sensibilidad etiquetada de 0,25 EU/mL, la dilución de Spike debe tener una concentración de 5 EU/mL, de manera que adicionar 0,01 mL (0,05 EU) en 0,1 mL de la muestra tendría una aproximada de 0,5 EU/mL que correspondería a 2,0 lambda/mL.

b. La mezcla de reacción consiste en:

100 μ L de la dilución y

100 μ L del reactivo Pyrotell,

Luego agitar los tubos de 20 a 30 segundos e incubar a 37°C por 1 hora.

c. Lectura:

La reacción se considera positiva si se ha formado un coágulo que al invertir el tubo no cae y negativa si no forma coágulo o si este cae al invertir el tubo.

Cada dilución se debe trabajar por cuadruplicado como se muestra en el Ejemplo 1.

Luego se determina la sensibilidad, determinando la media geométrica de los resultados obtenidos:

Ejemplo 1

Sensibilidad etiquetada (λ) = 0,25 EU/mL

Tubos	CONCENTRACION DEL CSE (EU/mL)				Control Negativo
	$2\lambda = 0,5$	$1\lambda = 0,25$	$0,5\lambda = 0,125$	$0,25\lambda = 0,0625$	
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-

Endpoint = última dilución positiva

\bar{x} = Media geométrica

Endpoint	Logaritmo	-2,40824
EU/mL	Endpoint	$\bar{x} = \frac{-2,40824}{4} = -0,60206$
0,25	-0,60206	
0,25	-0,60206	
0,25	-0,60206	Antilog. de -0,60206 = 0,25
0,25	-0,60206	

	$\Sigma = -2,40824$	

La sensibilidad confirmada es de 0,25 EU/mL

Ejemplo 2

Sensibilidad etiquetada (λ) = 0,25

Tubos	CONCENTRACION DEL CSE (EU/mL)				Control Negativo
	$2\lambda = 0,5$	$1\lambda = 0,25$	$0,5\lambda = 0,125$	$0,25\lambda = 0,0625$	
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-

Endpoint = última dilución positiva
 \bar{x} = Media geométrica

Endpoint	Logaritmo	-1,80618
EU/mL	Endpoint	$\bar{x} = \frac{-1,80618}{4} = -0,45154$
0,25	-0,60206	
0,25	-0,60206	
0,25	-0,30103	Antilog. de -0,451545 = 0,35 0,25
0,25	-0,30103	

	$\Sigma = -1,80618$	

La sensibilidad confirmada es de 0,35 EU/mL

6. Prueba preliminar de Gel Clot

Esta prueba determina el contenido de Endotoxinas que tiene el producto, se procede en el siguiente orden:

- Se determina la Máxima Dilución Válida (MVD) empleando la fórmula:

$$MVD = \frac{\text{Límite de Endotoxinas} \times [\text{Muestra}]}{\text{Lambda}}$$

donde:

Límite de Endotoxinas = Límite permisible de Endotoxinas
 [Muestra] = Concentración de la muestra
 Lambda = Sensibilidad etiquetada del reactivo

- b. Se preparan diluciones crecientes de la muestra sin sobrepasar la MVD; por ejemplo:

Para una MVD de 1000 se podrían realizar diversas opciones de diluciones:

1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ó

1/200, 1/400, 1/800, 1/1000 ó

1/125, 1/250, 1/500, 1/1000

- c. Por cada dilución se dispone 4 tubos que corresponden a la muestra por duplicado y los dos tubos restantes a sus respectivos control positivo

El control positivo contiene 100 µL de la muestra y 10 µL de la dilución del Spike. Como control negativo se emplea agua apirogénica.

La mezcla de reacción es como sigue:

	M1	M2	C.P.M1	C.P.M2	C.N.A	C.P.A
Muestra	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-----	-----
React. Pyrotell	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100µL
Spike	-----	-----	10 µL	10 µL	-----	10 µL
Agua apirogénica	-----	-----	-----	-----	100 µL	100µL

C.P.M1 = Control positivo de M1

C.P.M2 = Control positivo de M2

C.N.A. = Control negativo de agua apirogénica

C.P.A. = Control positivo de agua apirogénica

Luego se incuba a 37°C ± por 1 hora y se realiza la lectura.

- d. Determinación de la concentración de endotoxinas

Se registran los resultados obtenidos por cada dilución, luego se multiplica la inversa de la última dilución en que el producto fue positivo por la sensibilidad etiquetada del reactivo. A continuación se describen dos ejemplos:

Ejemplo 3

Si las condiciones fueran las siguientes:

Sensibilidad etiquetada del reactivo (λ) = 0.25 EU/ml

MVD del producto = 64

Tubos	DILUCIONES DE LA MUESTRA								
	D.I.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64		C.N.
1	+	+	+	-	-	-	-		-
2	+	+	+	-	-	-	-		-
C.P.1	+	+	+	+	+	+	+		+
C.P.2	+	+	+	+	+	+	+		+

D.I. = Dilución Inicial

C.P. = Controles Positivos

Concentración de Endotoxinas = $\Lambda \times IE$

donde :

Λ = Sensibilidad del reactivo

IE = Inversa de la última dilución positiva

Concentración de Endotoxinas = $0.25 \times 4 = 1 \text{ EU/mL}$

Interpretación

La muestra del producto tiene una concentración de Endotoxinas de 1 EU/mL y no presenta inhibición en ninguna de las diluciones ensayadas.

Ejemplo 4

Si las condiciones fueran las siguientes:

Sensibilidad etiquetada del reactivo (λ) = 0,25 EU/mL

MVD del producto = 128

Tubos	DILUCIONES DE LA MUESTRA								
	D.I.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	C.N.
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C.P.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+
C.P.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+

D.I. = Dilución Inicial

C.P. = Controles Positivos

Concentración de Endotoxinas = $0,25 \times 8 = 2$ EU/mL

Interpretación

La muestra del producto tiene una concentración de endotoxinas de 2 EU/mL y presenta inhibición hasta la dilución 1:2, lo que implica que el producto debe ser evaluado a diluciones mayores de 1:2.

7. Prueba de Validación (Inhibición o Magnificación)

Esta prueba tiene como objetivo determinar si la Técnica de LAL-gel clot es aplicable al producto a evaluar.

La prueba es válida si el producto por si mismo no inhibe ni magnifica la reacción mas allá de $0,5$ a 2λ , para lo cual se procede en el siguiente orden:

- Se selecciona una dilución en que el producto sea negativo; esta dilución no debe exceder la MVD. La MVD puede ser incrementada empleando un reactivo más sensible, de manera que al incrementar la MVD se están diluyendo los posibles excipientes del producto que podrían afectar la reacción.
- Con la dilución negativa del producto que ha sido seleccionada, se prepara cuatro concentraciones con el control de estándar de endotoxinas que corresponden a:

Concentración final	
Muestra de la dilución negativa + Endotoxina	2 lambda/ml
Muestra de la dilución negativa + Endotoxina	1 lambda/ml
Muestra de la dilución negativa + Endotoxina	0,5 lambda/ml
Muestra de la dilución negativa + Endotoxina	0,25 lambda/ml
Muestra de la dilución negativa	Control negativo

- c. Se disponen dos series de tubos por cuadruplicado, la primera serie corresponde a las cuatro concentraciones de la muestra de la dilución negativa y la segunda serie a concentraciones de endotoxinas realizadas en agua apirogénica, como se muestra en los siguientes ejemplos:

Ejemplo 5

Siguiendo con el Ejemplo 4, consideraremos que la última dilución positiva fue 1:8, por lo que para seleccionar la dilución que se empleará para la prueba de validación, multiplicamos esta dilución por 4 ó más, sin que el resultado obtenido sobrepase la MVD

MVD = 128

Endpoint = 1:8

Si multiplicamos x 4 la inversa del Endpoint es = 32

La dilución seleccionada para realizar la prueba de validación será 1:32, pudiéndose obtener diversos resultados. A continuación se describen tres ejemplos de resultados posibles, con sus respectivas interpretaciones:

Ejemplo 5a : Si se obtuvieran los siguientes resultados :

TUBOS	CONCENTRACION CSE EN AGUA (EU/mL)					CONCENTRACION CSE EN PRODUCTO (EU/mL)				
	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.
1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

Interpretación 5a : El producto no inhibe ni magnifica la reacción, por que se han obtenido iguales resultados en el agua y en la muestra.

Ejemplo 5b : Se obtuvieron los siguientes resultados :

TUBOS	CONCENTRACION CSE EN AGUA (EU/mL)					CONCENTRACION CSE EN PRODUCTO (EU/mL)				
	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.
1	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
3	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
4	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Interpretación 5b : El producto magnifica en el doble de la dilución, por lo tanto se encuentra en el rango aceptable y es válida la prueba.

Ejemplo 5c : Si se obtuvieran los siguientes resultados :

TUBOS	CONCENTRACION CSE EN AGUA (EU/mL)					CONCENTRACION CSE EN PRODUCTO (EU/mL)				
	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.	0,5	0,25	0,125	0,0625	C.N.
1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-

Interpretación 5c : El producto magnifica en tres veces o más su dilución, por lo tanto se encuentra fuera del rango aceptable y la prueba no es válida para el producto evaluado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *The United States Pharmacopeial Convention* (1994). U.S. Pharmacopeia National Formulary 18. 23ª Ed. Massachusetts, Rant McNally. 2391 pp.
2. *Akers, M.J. Parenteral quality control.* (1985) Sterility, pyrogen, particulate and Package integrity testing. IN: *Advances in Parenteral Sciences.* vol. 1. New York, Marcel Dekker. 253 pp.
3. *Novitsky. T.J.* (1991). Discovery to commercialization: The blood of the Horseshoe Crab. *Oceanus, International Perspectives on our ocean environment*, 27(1):13-18

Esta publicación se terminó de imprimir
en Diciembre de 1996 en los
Talleres Gráficos de Art. Lautrec S.R.Ltda.
Av. Paseo de la República 731-Lima 13
Telfax 423-7616

