



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC



Página: 1 De:18

INFORME FINAL

NOMBRE DEL ESTUDIO	PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Toxicidad Aguda		
NÚMERO DE SOLICITUD	UNIPREC/17/044-4		
FECHA DE INICIO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	23/02/18	FECHA DE TÉRMINO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	23/04/18
DURACIÓN DEL ESTUDIO	15/02/18 a 07/05/18 (2 meses, 22 días)		
FECHA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	08/02/2018		
FECHA DE RECEPCIÓN DEL PRODUCTO	05/02/17		
MEDICAMENTO DE REFERENCIA (cuando aplique)	NA		
INVESTIGADOR PRINCIPAL/ DIRECTOR DE ESTUDIO	Marisol Rivera Huerta		
DIRECTORA DE LA UNIPREC	MA. ISABEL GRACIA MORA		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, CONJUNTO "D-E", FACULTAD DE QUÍMICA. CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. CIUDAD UNIVERSITARIA. C.P. 04510. TEL. 5622-5375		
PATROCINADOR	Agustín Carrillo, Biograft de México, S.A. de C.V.		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	SAN FRANCISCO 1103, ANEXO A, PLANTA BAJA, COLONIA DEL VALLE, DELEGACIÓN BENITO JUÁREZ, CDMX, C.P. 03100		

	Nombre	Puesto	Fecha	Firma
Elaboró	Marisol Rivera Huerta	Investigador principal/Director de estudio	27/04/18	
	Isabel Gracia Mora	Directora de la UNIPREC		
Revisó	Isabel Gracia Mora	Directora de la UNIPREC	02/05/18	
	Ruth Bustamante García	Responsable de diseño experimental y análisis estadístico		
	Mabel Tinoco Méndez	Responsable de Aseguramiento de la Calidad		
Autorizó	Francisco Sánchez Bartéz	Responsable Sanitario/de Asuntos Regulatorios	03/05/18	



Nombre del estudio: PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Toxicidad Aguda.

Índice

Resumen	3
1. Introducción	3
2. Objetivo	4
3. Materiales y métodos	4
3.1 Producto de prueba	4
3.2 Preparación del producto de prueba	4
3.3 Sistema de prueba	4
3.4 Justificación del sistema de prueba	5
3.5 Tamaño de Muestra	5
3.6 Identificación de los animales	5
3.7 Condiciones de alojamiento y alimentación	5
3.8 Diseño experimental	6
3.8.1 Grupos de estudio	6
3.8.2 Administración de la dosis	7
3.8.3 Justificación de la vía de administración y niveles de dosis	7
3.8.4 Monitoreo de los animales	7
3.8.5 Procedimientos, observaciones y mediciones a los animales vivos	8
3.8.5.1 Peso	8
3.8.5.2 Procedimientos terminales	8
3.8.5.3 Necropsia e histopatología	8
3.8.6 Análisis estadístico	8
4. Resultados	9
4.1 Observaciones clínicas	9
4.2 Peso	11
4.2.1 Machos	11
4.2.2 Hembras	13
4.3 Necropsia	14
4.3.1 Descripción macroscópica	14
4.3.2 Descripción microscópica	14
5. Discusión	14
6. Conclusiones	14
7. Referencias	15
8. Retención de registros, muestras y especímenes:	15



Resumen

El objetivo de este estudio es evaluar si el dispositivo con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas (DBM NANO), ocasiona toxicidad después de la administración a dosis única. La evaluación se realizó en ratas HsdHan®:WIST ambos sexos. Este sistema de prueba nos proporcionará información del perfil de seguridad del DBM NANO utilizando los lineamientos descritos en las guías ISO 10993-11:2006 para la realización de la prueba de toxicidad sistémica aguda.

El DBM NANO se administró por vía intramuscular en ratas jóvenes de ambos sexos a la dosis de 1 mL/Kg a dosis única. Para el estudio de toxicidad aguda se usaron 5 ratas por grupo/sexo.

Cabe mencionar que el protocolo preclínico para estas pruebas fue sometido a la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM, teniendo un dictamen favorable.

1. Introducción

La industria de los dispositivos médicos se ha convertido en últimas décadas en una de las más productivas y con mayor crecimiento anual y su evolución ha estado en gran medida favorecida por progresos científicos y tecnológicos recientes (mejora de los sistemas de adquisición, procesamiento, análisis y telecomunicaciones de señales fisiológicas, desarrollo de sistemas de interacción entre computadoras y el sistema nervioso de seres vivos, entre otros).

Siendo la salud un factor importante para el bienestar y desarrollo social es necesario establecer los requisitos que se deben de cumplir durante el proceso de fabricación y uso de dispositivos médicos que garanticen la calidad y funcionalidad de los mismos.

Es por esto que la Unidad de Investigación Preclínica oferta las pruebas necesarias para poder certificar la seguridad de los dispositivos médicos bajo las más estrictas condiciones de calidad científica y experimental, utilizando los lineamientos de las guías ISO 10993-11:2006 para la realización de la prueba de toxicidad sistémica aguda.

Los estudios de seguridad están encaminados a disminuir el riesgo de toxicidad en el humano. En el caso de un dispositivo médico, un estudio de toxicidad aguda permite conocer y evaluar los efectos biológicos adversos a corto plazo en una sola exposición o



una serie corta de exposiciones durante un breve intervalo (generalmente de 24 horas o menos) que se producen después del contacto con dicho dispositivo o de la sustancias que puedan estar en una elución del mismo^{1, 2}.

2. Objetivo

Conocer si la administración por vía intramuscular de la elución del material de prueba en diferentes medios produce una toxicidad sistémica aguda.

3. Materiales y métodos

3.1 Producto de prueba

El patrocinador proporcionó el dispositivo médico en jeringas prellenadas con fecha de caducidad de un año (05/12/18) y número de serie 117. El producto de prueba se almacenó a temperatura ambiente en la gaveta ubicada en el almacén de UNIPREC y registrado en la Bitácora de usuarios de gaveta para resguardo del producto (BUG-UNAM-UNIPREC-01).

3.2 Preparación del producto de prueba

La preparación del dispositivo médico DBM NANO se realizó durante el periodo de aclimatación de los animales. El DBM NANO se pesó en la balanza analítica BA-CC-02 utilizando para su contención y pesaje un tubo Falcon de 15 mL, la preparación de las eluciones se realizaron dentro de la campana de flujo laminar/Gabinete de seguridad biológica CFCC-UNIPREC-02, para preparar las eluciones se utilizó Solución Salina Fisiológica 0.9% lote: D16Y496, caducidad Mayo 19 y Glicerol al 2.5 % lote: 1706663, caducidad Junio 19 preparada con agua inyectable lote: R16T73, caducidad Oct 19; con un periodo de incubación de 72 ± 2 h y $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y para la elución con medio se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) lote: 80510171, fecha de caducidad Jun 2018 adicionado con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) lote: 63051336 caducidad Jun 2020 con un periodo de incubación de 24 ± 2 h y $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en la incubadora Shel Lab código INCC-UNIPREC-01 quedando registrada esta actividad en la bitácora de actividades por proyecto BAP-UNAM-UNIPREC-03.

3.3 Sistema de prueba

Se emplearon ratas HsdHan[®]:WIST[®]"S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) adultos jóvenes de ambos sexos, al inicio de la ejecución del estudio la variación de peso entre animales no excedió $\pm 20\%$ de la media de peso por sexo que en hembras fue de 155.5g y en machos



141.8g, las hembras eran nulíparas y no gestantes y los animales no habían sido utilizados en experimentos anteriores.

Los animales fueron obtenidos del Centro UNAM-ENVIGO de Producción de Animales de Laboratorio (Barrera 650) con sede en la Planta Baja de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con nota de remisión 2540 y certificado de salud expedido el día 23 de febrero de 2018.

3.4 Justificación del sistema de prueba

Se utilizaron ratas HsdHan[®]:WIST por ser la especie de elección para pruebas de toxicología.

3.5 Tamaño de Muestra

El número de animales en el protocolo se considera que es el mínimo necesario por razones estadísticas, normativas y científicas.

3.6 Identificación de los animales

Una vez que los animales fueron aleatorizados para asignarlos a un grupo experimental, se utilizaron muescas en las orejas como método de identificación final⁴ y en cada jaula se colocó una tarjeta de identificación (FTJ-UNAM-UNIPREC-01), tales acciones fueron registradas en la Bitácora de Actividades de Experimentación Animal con código BAP-UNAM-UNIPREC-03 y se llevaron a cabo bajo lo descrito en el Procedimiento Normalizado de Operación para el manejo de los animales (PNOMA-UNAM-UNIPREC-01).

3.7 Condiciones de alojamiento y alimentación

Machos y hembras se alojaron en la sala 4, bajo condiciones ambientales controladas en el Área de experimentación animal de la Unidad de Investigación Preclínica de la Facultad de Química de la UNAM y en conformidad con la NOM-062-ZOO-1999, ciclos de luz de 12/12 h registrado en el formato de ciclos luz-obscuridad FLO-UNAM-UNIPREC-01; extracción e inyección de aire con al menos 18 recambios por hora; éste se realiza mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de 3 µm en el aire de inyección. La temperatura y humedad relativa en el cuarto experimental se mantiene en 22 °C ± 2 °C y 40-70% respectivamente estos registros se anotan en el formato de registro de temperatura y humedad en salas de experimentación FTH-UNAM-UNIPREC-01. Las condiciones ambientales son monitoreadas de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento Normalizado de Operación para el monitoreo ambiental (PNOMO-UNAM-UNIPREC-01).



Las jaulas para su alojamiento son de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 32 x 47 x 20 cm albergando en cada jaula de 3 a 5 animales⁴, la cama que se utilizó fue Pine Shavings Bedding de ENVIGO® y el alimento proporcionado es Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y agua filtrada del Sistema purificador de agua modular con luz UV (SPAL-UNIPREC-01) *ad libitum*.

3.8Diseño experimental

En la recepción de los animales, estos fueron aleatorizados, identificados y pesados en la balanza marca OHAUS con código BAEA-UNIPREC-02; permanecieron un periodo de 5 días en aclimatación, tiempo en el que se verificó su estado de salud. Estas actividades fueron registradas en la Bitácora de Actividades por Proyecto de experimentación animal BAP-UNIPREC-03, realizándose bajo las directrices del Procedimiento Normalizado de Operación para el manejo de los animales (PNOMA-UNAM-UNIPREC-01).

3.8.1 Grupos de estudio

En el cuadro 1 se muestran algunas especificaciones sobre la conformación de los grupos, así como el número y sexo de los animales a utilizar para la prueba de toxicidad aguda. De una población de 60 ratas HsdHan®:WIST; 30 hembras y 30 machos, se formaron 6 grupos por sexo, los grupos están conformados por 5 animales cada uno.

Cuadro 1. Grupos de estudio, número y sexos de los animales a utilizar en el estudio de toxicidad aguda dispositivo médico DBM NANO.

Grupo	Elución	Estirpe Ratas HsdHan®:WIST	
		Número de animales	
1	DBM NANO + SSF 0.9%	5H	5M
2	DBM NANO + Glicerol al 2.5%	5H	5M
3	DBM NANO + DMEM con 10% de FBS	5H	5M
4	SSF 0.9%	5H	5M
5	Glicerol al 2.5%	5H	5M
6	DMEM con 10% de FBS	5H	5M
Total		30	30

H: Hembras, M: Machos; SSF: Solución Salina Fisiológica; DMEM: Medio de Cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium; BFS: Fetal Bovine Serum.



3.8.2 Administración de la dosis

El día de administración de las eluciones con DBM NANO y vehículos (Día 1) las ratas se pesaron en la balanza OHAUS (BAEA-UNIPREC-02) registrando el peso en el Formato de pesos de toxicidad aguda (FPT-UNAM-UNIPREC-04), para realizar los cálculos y administrar 1 mL/Kg de cada elución empleada en el grupo correspondiente, se usó el formato en excel de cálculo de dosis (FCAD-UNAM-UNIPREC-01) y posteriormente el volumen correspondiente a cada rata se anotó en el formato de pesos de toxicidad aguda (FPT-UNAM-UNIPREC-04). Se sacaron los tubos Falcón de la incubadora INCC-UNIPREC-01 tomando en cuenta la ISO 10993-12 que hace referencia la preparación del material de referencia (dispositivo médico) las eluciones con glicerol 2.5% y SSF 0.9% se incubaron 72 ± 2 h y 37 ± 1 °C y la elución con DMEM más 10% de suero fetal bovino 24 ± 2 h y 37 ± 1 °C.

Se realizó la administración a cada rata por vía intramuscular utilizando jeringas de 0.5 mL de la marca BD Ultra-Fine, lote 5194710 fecha de caducidad 2020-09, una por rata, registrando la hora de administración al inicio y término en cada grupo en el Formato de pesos de toxicidad aguda (FPT-UNAM-UNIPREC-04) para la evaluación y registro de la signología se utilizó el Formato para la Evaluación de Signos Clínicos en la Toxicidad Aguda (FES-UNAM-UNIPREC-01).

3.8.3 Justificación de la vía de administración y niveles de dosis

La vía de administración intramuscular es la vía apropiada para dispositivos con un entorno de contacto con el tejido muscular que propicie la lixiviación química¹, los niveles de dosis fueron determinados por el peso de los animales y el volumen máximo permitido para esta vía, 1 mL/Kg¹.

3.8.4 Monitoreo de los animales

Los animales se observaron de forma individual durante los primeros 30 minutos después de dosificar y periódicamente durante las primeras 24 horas (con especial atención durante las primeras 4 horas) y posteriormente cada día, por un total de 14 días. Para el registro del monitoreo individual se utilizó el Formato para la evaluación de signos clínicos en la toxicidad aguda (FES-UNAM-UNIPREC-01) descrito en el Procedimiento normalizado de operación para las pruebas de toxicidad (PNOPT-UNAM-UNIPREC-01). Los signos revisados fueron descarga nasal, cianosis, piloerección, lacrimación, ptosis, fotofobia, postración, temblores y alteraciones en la respuesta somática, el tono muscular, la micción, la defecación o la respiración. Ver cuadro 2 y 3.



3.8.5 Procedimientos, observaciones y mediciones a los animales vivos

3.8.5.1 Peso

Se registró el peso de cada animal los días 0 (recepción de los animales), día 1 (día de la administración), 2,3, 7 y 14 post-administración y se registraron en el Formato de pesos de toxicidad aguda (FPT-UNAM-UNIPREC-04) de acuerdo al Procedimiento normalizado de operación para toxicidad (PNOPT-UNAM-UNIPREC-01).

3.8.5.2 Procedimientos terminales

Al término del estudio el día 14 se les aplicó eutanasia a 30 ratas (15 machos y 15 hembras) y el día 15 se le aplicó eutanasia a las 29 ratas restantes del estudio (14 machos y 15 hembras), el macho número 18 se encontró muerto en su jaula por lo que se llevo al área de anatomopatología para realizar la necropsia y recolección de órganos. La eutanasia se llevo a cabo utilizando la cámara de dióxido de carbono CCEA-UNIPREC-01 método permitido en la NOM-062-ZOO-1999, los cadáveres fueron enviados al área de anatomopatología junto con el formato de distribución de muestras biológicas FRM-UNAM-UNIPREC-01.

3.8.5.3 Necropsia e histopatología

De acuerdo al protocolo, se realizó la necropsia de todas las ratas HsdHan:WIST machos y hembras. Con excepción del macho número 18 del grupo control de Solución Salina Fisiológica 0.9%, en ninguno de los animales de los grupos de estudio, se observaron lesiones macroscópicas en algún órgano o sitio de inoculación, por lo que no se tomaron muestras de tejido para su evaluación histológica.

3.8.6 Análisis estadístico

Para todos los grupos de machos y hembras de las ratas HsdHan[®]:WIST se determinaron los parámetros de estadística descriptiva: promedio, desviación estándar (D.E.), valor máximo, mínimo, % de coeficiente de variación (%C.V.) e intervalo de confianza al 95% con respecto de la media. Para la determinación del rango del intervalo de confianza y el % de cambio de peso se realizó mediante la hoja de cálculo Excel: % cambio de pesos e IC al 95% (d0-d14).

Se utilizó como prueba estadística la Correlación de Spearman o Pearson^{5,6} con 95% de confiabilidad, estas técnicas son bivariada y se emplean en campos multivariados, que se derivan de un análisis matricial con linearización, estas pruebas permiten establecer



similitudes entre variables o individuos. El coeficiente de correlación fluctúa entre $-1 \leq r \leq 1$. Cuando la $r=+$ la relación es directa entre las variables. Si $r=-$ la relación es inversa y cuando $r=0$ son independientes.

Además, se efectuó el análisis de varianza de dos vías para determinar que no existen diferencias significativas con $p=0.05$ con relación a los factores de estudio (Grupo, Día de muestreo, para la variable: Peso (g), ya que esta prueba determina si los valores de una variable dependiente depende de los niveles de dos factores o la interacción de ambas. En donde hubo diferencias significativas a $p<0.05$ se realizó la prueba *post-hoc*: prueba *t* por el método Holm-Sidak.

Para la comparación del % de cambio de peso entre e intra grupos así como para la diferencia del día 14 con respecto al día 0 se utilizaron las pruebas Kruskal-Wallis a $p<0.05$; prueba *post-hoc*: Dunn's (comparación de rangos) o Anadeva de una vía a $p<0.05$; prueba *post-hoc*: prueba de *t* por el método de Holm-Sidak (comparación de medias), esto fue conforme al criterio de cumplir con la prueba de normalidad y/o equivarianza.

Las pruebas antes mencionadas fueron calculadas mediante el programa Sigma plot versión 13.0[®] 7.

4. Resultados

3.9 Observaciones clínicas

No se presentaron signos de toxicidad por vía intramuscular en ninguna de las eluciones empleadas para el DBM NANO ni en los grupos control. El resumen de los signos evaluados en el estudio se muestra en los cuadros 2 y 3. Podemos observar que no se encontraron cambios en la piel y el pelaje, ojos y membranas mucosas, tampoco se presentaron cambios en el sistema respiratorio y nervioso (central y autónomo), así como en la actividad motora y comportamiento anómalo, sin embargo se encontró muerto al macho número 18 el día 15 del estudio.



Cuadro 2. Signología clínica en ratas machos HsdHan[®]:WIST con la dosis de 1 mL/Kg de las eluciones con DBM NANO y controles por vía intramuscular.

TABLA DE SIGNOS CLÍNICOS PARA TOXICIDAD AGUDA						
Grupo:	1	2	3	4	5	6
Sexo:	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
Estirpe/ Cepa	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST
Producto	DBM NANO + SSF 0.9%	DBM NANO + Glicerol al 2.5%	DBM NANO + DMEM con 10% de FBS	SSF 0.9%	Glicerol al 2.5%	DMEM con 10% de FBS
Dosis (mL/Kg)	1	1	1	1	1	1
# de animales	5	5	5	5	5	5
Mortalidad	0/5	0/5	0/5	1/5*	0/5	0/5
Actividad locomotora	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Sensibilidad al sonido	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cola anormal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Comportamiento exploratorio	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Comportamiento agresivo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Convulsiones	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Tono muscular en extremidades	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Respuesta somática	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Postración	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Temblores	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lacrimación	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ptosis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Defecación	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Micción	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cambios en la respiración	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Descarga nasal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cianosis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Piloerección	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*El macho 18 murió el día 15 del estudio



Cuadro 3. Signología clínica en ratas hembras HsdHan[®]:WIST con la dosis de 1 mL/Kg de las eluciones con DBM NANO y controles por vía intramuscular.

TABLA DE SIGNOS CLÍNICOS PARA TOXICIDAD AGUDA						
Grupo:	1	2	3	4	5	6
Sexo:	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra
Estirpe/ Cepa	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST	Rata/ HsdHan:WIST
Producto	DBM NANO + SSF 0.9%	DBM NANO + Glicerol al 2.5%	DBM NANO + DMEM con 10% de FBS	SSF 0.9%	Glicerol al 2.5%	DMEM con 10% de FBS
Dosis (mL/Kg)	1	1	1	1	1	1
# de animales	5	5	5	5	5	5
Mortalidad	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Actividad locomotora	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Sensibilidad al sonido	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cola anormal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Comportamiento exploratorio	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Comportamiento agresivo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Convulsiones	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Tono muscular en extremidades	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Respuesta somática	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Postración	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Temblores	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lacrimación	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ptosis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Defecación	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Micción	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cambios en la respiración	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Descarga nasal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cianosis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Piloerección	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

3.10 Peso

3.10.1 Machos

En la Figura 1 se muestra el promedio de los pesos (g) $\pm$ D.E. de las ratas machos HsdHan[®]: WIST para los grupos administrados con las eluciones DBM NANO + SSF 0.9%, DBM NANO + Glicerol al 2.5%, DBM NANO + DMEM con 10% de FBS y los grupos controles: Solución Salina Fisiológica 0.9%, Glicerol 2.5% y medio de cultivo DMEM con 10 de FBS, en función del día de pesaje (0, 1, 2, 3, 7 y 14), en donde las diferencias encontradas con respecto al día corresponden a las tendencias esperadas de aumento del peso en función del tiempo; las diferencias entre grupos fueron entre Grupo 3 que



presentó valores mayores al Grupo 2, entre Grupo 4 que fue mayor al Grupo 1 y 2 y entre el Grupo 5 Vs. Grupo 1, 2, 3, y 6 ya que los valores para el grupo 5 los valores de peso iniciales de las ratas Machos fueron mayores, sin embargo con respecto a la evaluación de las interacciones a nivel global no hubo diferencias ($p=1.0$).

Ratas Machos HsdHan[®]: WIST Peso (g)

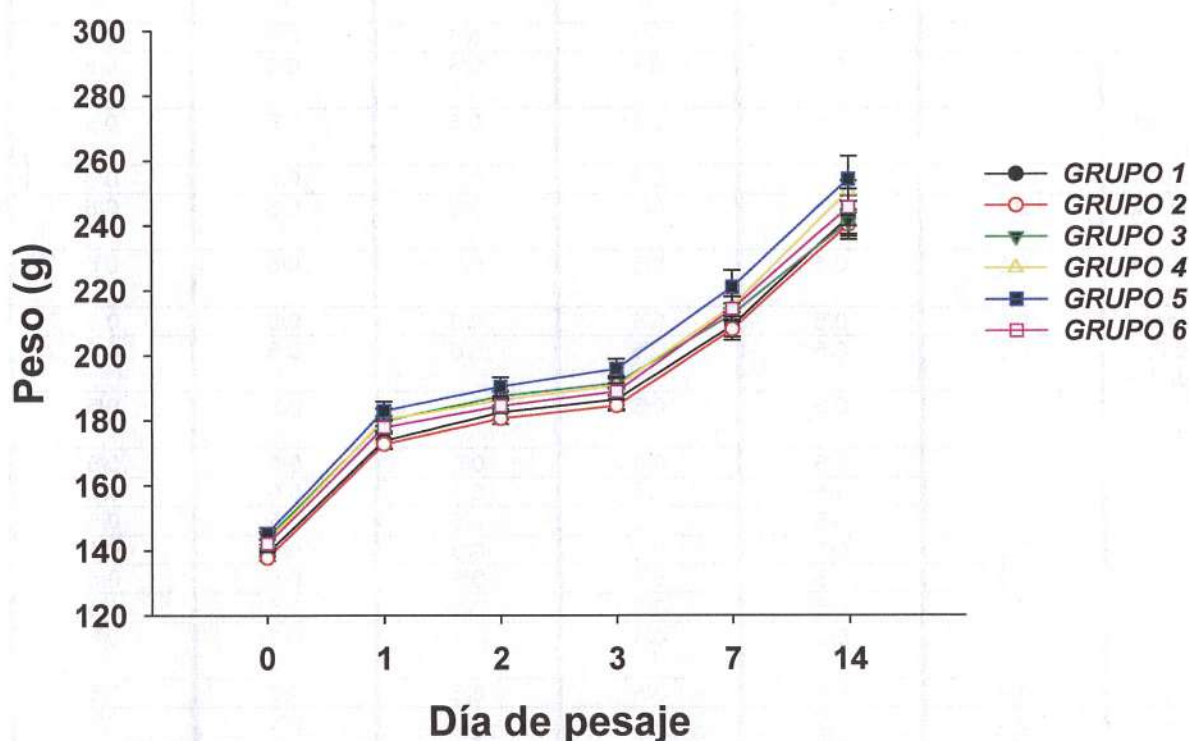


Figura 1. Pesos (g) de las ratas machos HsdHan[®]: WIST, cada punto representa el promedio del peso (g) $\pm$ D.E., para los grupos administrados con las eluciones DBM NANO + SSF 0.9% (Grupo 1), DBM NANO + Glicerol al 2.5% (Grupo 2), DBM NANO + DMEM con 10% de FBS (Grupo 3) y los grupos controles: Solución Salina Fisiológica 0.9% (Grupo 4), Glicerol 2.5% (Grupo 5) y medio de cultivo DMEM con 10% de FBS (Grupo 6) en función del día de pesaje (0, 1, 2, 3, 7 y 14). Diferencias significativas a $p < 0.05$ entre el *Grupo 3 Vs. Grupo 2; +Grupo 4 Vs. 1 y 2 y ^Grupo 5 Vs. 1, 2, 3 y 6 respectivamente.



3.10.2 Hembras

En la Figura 2 se muestra el promedio de los pesos (g) $\pm$ D.E. de las ratas hembras HsdHan[®]: WIST para los grupos administrados con las eluciones DBM NANO + SSF 0.9%, DBM NANO + Glicerol al 2.5%, DBM NANO + DMEM con 10% de FBS y los grupos controles: Solución Salina Fisiológica 0.9%, Glicerol 2.5% y medio de cultivo DMEM con 10% de FBS en función del día de pesaje (0, 1, 2, 3, 7 y 14), en donde las diferencias encontradas con respecto al día corresponden a las tendencias esperadas de aumento del peso en función del tiempo; en relación a las diferencias entre grupos estas fueron entre el Grupo 6 Vs. Grupo 1, 3, 4 y 5 ya que los valores para el grupo 6 los valores de peso iniciales de las ratas hembras fueron mayores, sin embargo con respecto a la evaluación de las interacciones a nivel global no hubo diferencias ($p=1.0$).

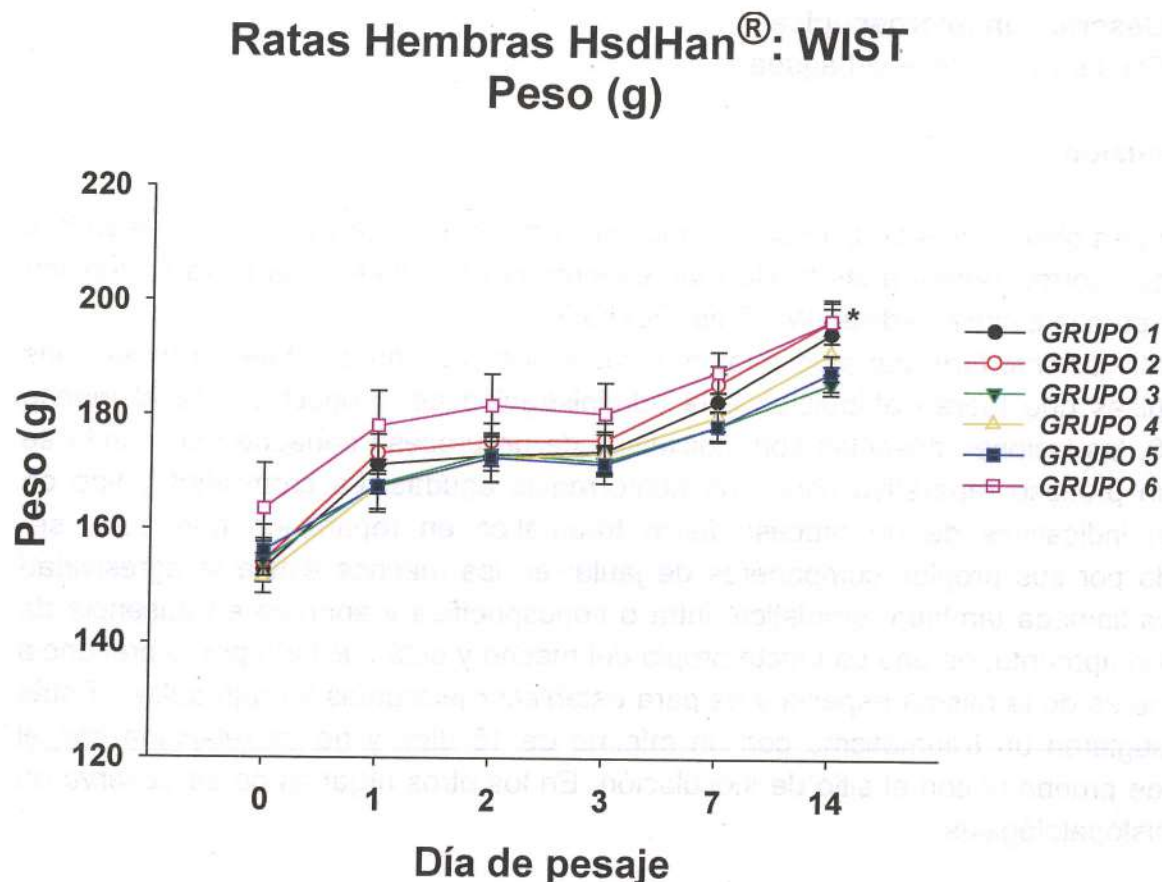


Figura 2. Pesos (g) de las ratas hembras HsdHan[®]: WIST, cada punto representa el promedio del peso (g) $\pm$ D.E., para los grupos administrados con las eluciones DBM NANO + SSF 0.9% (Grupo 1), DBM NANO + Glicerol al 2.5% (Grupo 2), DBM NANO + DMEM con 10% de FBS (Grupo 3) y los grupos controles: Solución Salina Fisiológica 0.9% (Grupo 4), Glicerol 2.5% (Grupo 5) y medio de cultivo DMEM con 10% de FBS (Grupo 6) en función del día de pesaje (0, 1, 2, 3, 7 y 14). *Diferencias significativas a $p < 0.05$ entre el Grupo 6 Vs. Grupo 1, 3, 4 y 5 respectivamente.



3.11 Necropsia

Para el macho número 18 que se encontró muerto el día 15, se procedió a realizar la necropsia de acuerdo al Procedimiento Normalizado de Operaciones para la realización de Necropsias PNONE-UNIPREC-01. El animal se registró en la bitácora BRM-UNAM-UNIPREC-05, para asignarle número de caso. A continuación se describen los hallazgos.

3.11.1 Descripción macroscópica

Vertebra (L6): zonalmente se observa pérdida de continuidad del tejido, en esta zona se observa proliferación de fibroblastos, vasos sanguíneos de nueva formación, osteoblastos y osteoclastos; inmersos en un estroma de abundantes fibras de colágena sin arreglo específico. Multizonalmente se observan áreas de hemorragia.

3.11.2 Descripción microscópica

Vértebra: Fractura zonal leve subaguda.

4. Discusión

Las diferencias observadas en el peso de machos y hembras no se consideran relevantes debido a que corresponden a las tendencias esperadas de aumento del peso en función del tiempo para la estirpe HsdHan:WIST de ENVIGO.

En el estudio *postmortem* realizado a los machos y hembras, no se observaron lesiones macroscópicas que fueran atribuibles a la administración del producto, para el macho número 18, las lesiones descritas son indicativas de un proceso subagudo en donde se observa un proceso reparativo óseo con hemorragias agudas. La cronicidad y tipo de lesión son indicativos de un proceso físico traumático en reparación que pudo ser ocasionado por sus propios compañeros de jaula: en los machos existe la agresividad competitiva llamada también agonística, intra o conespecífica y aparece en ausencia de provocación aparente, es una conducta propia del macho y está sucitada por la presencia de congéneres de la misma especie y es para establecer jerarquías intragrupal⁸. Estas lesiones sugieren un traumatismo con un mínimo de 15 días y no se relaciona con el producto de prueba ni con el sitio de inoculación. En los otros órganos no se observaron lesiones histopatológicas.

5. Conclusiones

Considerando toda la información obtenida en la presente evaluación preclínica, DBM NANO demostró ser seguro a la dosis de 1 ml/Kg en los vehículos utilizados y siguiendo la metodología descrita en la ISO 10993-1:2006.



6. Referencias

1. ISO 10993-1:2006 Biological evaluation of medical devices, Part 11. Test for systemic toxicity.
2. Shayne C. Gad, Christopher P. Chengelis. Acute Toxicology Testing, Second edition. Academic Press 1998.
3. ISO 10993-1:2006 Biological evaluation of medical devices, Part 12. Sample preparation and reference.
4. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
5. Restrepo, LF, González J. De Pearson a Spearman. Rev Col Cienc Pec 207; 20:183-192.
6. Edgell, S.E., and S.M. Noon. 1984. Effect of violation of normality on the t-test of the correlation coefficient. Psychological Bulletin 95: 576-583.
7. Programa estadístico Sigma-plot versión 13[®].
8. De Flores F. T., Valdés M.M. Farmacología de la agresión, Revista Latinoamericana de Psicología, Vol. 15, núm. 3, 1983, pp. 327 – 348.

7. Retención de registros, muestras y especímenes:

El manejo de la documentación generada durante el estudio se llevó a cabo conforme lo indica el Manual de control de documentos y registros (MDR-UNAM-UNIPREC-01) y el Procedimiento para el manejo de la documentación de los protocolos preclínicos (PDP-UNAM-UNIPREC-01). La documentación se archivó en el expediente de análisis preclínico (EAP).

El EAP será resguardado por el archivista en el área de archivo de acuerdo al Procedimiento para el manejo de archivo (PMA-UNAM-UNIPREC-01). Así también se resguardarán en el archivo las muestras biológicas, laminillas, etc (que apliquen) y los resultados derivados de su procesamiento, así como otros registros que avalen la trazabilidad del estudio, conforme a lo estipulado en los Procedimientos Normalizados de Operación para el Manejo de Muestras Biológicas (PMM-UNAM-UNIPREC-01). Los documentos electrónicos quedarán resguardados en una nube virtual de uso exclusivo de la UNIPREC. El periodo de resguardo será por un periodo mínimo de cinco años. Al finalizar este tiempo el EAP y los materiales que apliquen serán entregados al Patrocinador quien lo conservará por el tiempo que juzgue pertinente.

Anexos: los que se incluyen en el protocolo así como el formato de desviaciones FRED-UNAM-UNIPREC-01 y el formato de registro de enmiendas FREM-UNAM-UNIPREC-01.



Declaración del investigador principal/director de estudio

El estudio se realizó bajo un Sistema de Gestión de la Calidad que asegura las BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO registro BPL 02/15 (EMA/OCDE) y en instalaciones autorizadas por SAGARPA/SENASICA, clave AUT-B-B-0314-010 y de acuerdo al protocolo aprobado y a los Procedimientos Normalizados de Operación de la UNIPREC.

La sustancia o producto de prueba cuenta con o se solicitó al patrocinador el certificado de fabricación requerido para la realización de dicho estudio.

Se detectaron desvíos durante la ejecución del estudio los cuales fueron analizados para medir su impacto y se determinaron las acciones a llevar a cabo (ver formato de registro de desviaciones (FRED-UNAM-UNIPREC-01)).

Como investigador principal/director de estudio asumo la responsabilidad de que este estudio se realizó cumpliendo estrictamente los principios de las buenas prácticas de laboratorio.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL / DIRECTOR DE ESTUDIO

Marisol Rivera Huerta



Declaración del responsable de aseguramiento de calidad

Durante la ejecución del estudio PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Toxicidad Aguda, UNIPREC/17/044-4, se llevaron a cabo diferentes inspecciones y los resultados de éstas fueron comunicadas a la Dirección de la UNIPREC así como al Investigador principal/director de estudio en las siguientes fechas:

Fecha de inspección	Etapas inspeccionada	Fecha de reporte de hallazgos
12/01/18	Revisión del protocolo	12/01/18
09/02/18	Revisión del cronograma	09/02/18
14/03/18	Inspecciones al estudio - Sistema de prueba (necropsias)	14/03/18
23/04/18	Revisión del reporte de resultados de estudios <i>postmortem</i> para desviaciones	23/04/18
02/05/18	Inspecciones al estudio - datos crudos (Bitácoras y formatos)	02/05/18
02/05/18	Revisión del informe final	02/05/18

Por todo lo anterior se confirma que el informe final refleja fielmente los datos crudos obtenidos durante la ejecución del mismo.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Mabel C. Tinoco Méndez



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC



Página: 18 De:18

FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

07/05/18

Marisol Rivera Huerta

(NOMBRE, FIRMA Y FECHA DEL INVESTIGADOR
PRINCIPAL/DIRECTOR DE ESTUDIO)