

Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay.

Mildrey Fariñas Medina^{*}, Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Yulieé López Feria^{*}, Daiyana Díaz Rivero^{*}, Sergio Sifontes Rodríguez^{}, Juan Francisco Infante Bourzac^{*}.**

^{*}Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

^{**}Universidad Central de las Villas "Martha Abreu", Carretera a Camajuaní Km 51/2, Municipio Santa Clara, Apartado Postal 54830, Villa Clara, Cuba.

Correspondencia a: Mildrey Fariñas Medina

Email: mfarinas@finlay.edu.cu

Resumen

Los estudios preclínicos logran la aprobación de los ensayos clínicos. Estos, para algunas vacunas conciben un ensayo de toxicidad por dosis única, por dosis repetida y de tolerancia local, así como estudios de toxicología de la reproducción. Constituyen un eslabón fundamental en la cadena de requisitos regulatorios de los estudios preclínicos toxicológicos pues permiten hacer una evaluación exhaustiva del producto a ensayar a través del comportamiento de los animales durante un tiempo predeterminado para registrar cronológicamente las lesiones generadas por la composición de la vacuna donde el adyuvante y el preservante muchas veces realizan el efecto tóxico de las misma o por su reacción con el sistema inmune, dando una mejor información referente a los productos en la fase preclínica de su desarrollo. Las ratas, y en particular las de la línea Sprague Dawley, es la especie utilizada en los ensayos toxicológicos. Para considerar un modelo animal relevante para la evaluación toxicológica preclínica de vacunas es imprescindible que sea sensible inmunológicamente al producto de ensayo. El objetivo del presente trabajo es dar a conocer los diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica de vacunas o candidatos vacunales a estudiar para la evaluación de los posibles efectos adversos provocados y la evolución de estos en el Instituto Finlay.

Palabras Clave: Toxicología, preclínica, ratas, estudios toxicológicos para vacunas.

Abstract

Experimental designs for the preclinic toxicology studies in the Finlay Institute.

The preclinic studies achieve the approval of the clinical assays. Some vaccines conceive a toxicity assay for unique dose, for repeated dose and local tolerance, as well as studies of reproduction toxicology. These studies constitute a fundamental link in the chain of regulatory requirements of the preclinic toxicologic studies since they allow to make an through the animals behaviour during a time predetermined to register the generated lesions by the vaccine composition of the chronologically where the adjuvant and the preserve many times they carry out the toxic effect of the same one or for their reaction with the immune system, giving a better information with respect to the products in the preclinic phase of their development. The rats, and in particular those of the Sprague Dawley line, is the species used in the toxicologic assays. To consider an excellent animal model for the preclinical toxicologic evaluation of vaccines it is indispensable that it is sensitive immunological to the assay product. The objective of the present work is to know the experimental designs for the studies of candidates' preclinic toxicology of the vaccine or vaccine candidates to study that allow a better evaluation of the possible adverse effects provoked and evolution of these in the Finlay Institute.

Key Words: Toxicology, preclinic, rats, vaccine toxicology study.

Introducción

Las evaluaciones toxicológicas de las vacunas son más rigurosas cada día. Las determinaciones relacionadas con su seguridad potencial, incluyen estudios de toxicidad sistémica general, tolerancia local, pirogenicidad, efectos inmunológicos adversos como la sensibilización, y, en algunos casos, estudios teratogénicos y del sistema reproductor. Las pruebas preclínicas de toxicidad a dosis única y en dosis repetidas brindan una valiosa información sobre la seguridad del producto, al incluir el estudio macroscópico e histopatológico de órganos importantes, así como evaluaciones de las vías de administración y el esquema de dosificación.¹

La mayoría de las vacunas absorbidas emplean fosfato e hidróxido de aluminio como adyuvantes. Sin embargo, la cantidad de adyuvante requerida para obtener una eficacia adecuada es tan elevada en ocasiones, que los principales efectos adversos relacionados con la vacuna se pueden deber sólo al adyuvante. No obstante, se ha demostrado en general la seguridad de estos adyuvantes a partir de su extenso uso clínico y preclínico.²

Las pruebas toxicológicas preclínicas consisten en una serie de estudios agudos, subagudos y crónicos diseñados para determinar los efectos tóxicos del compuesto sobre los sistemas de órganos en los animales.

El diseño experimental para los ensayos toxicológicos establecidos en el Instituto Finlay concibe la administración de la sustancia de prueba por la vía propuesta para uso clínico, en su formulación farmacéutica definitiva y el volumen máximo permisible por la especie animal por la vía elegida. Se incluyen dos grupos controles los no tratados y los (de vehículo o placebo que incluye a todos los componentes menos el principio activo de la formulación vacunal) que se les administran los componentes auxiliares (isotónicos, preservantes, adyuvantes, vehículo, etc).³

Además de los síntomas clínicos que pudieran mostrar los animales, se realiza el estudio anatomopatológico de todos los que mueran en el transcurso del ensayo y a todos los sobrevivientes al terminar este.

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer los diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica de vacunas o candidatos vacunales a estudiar para la <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

evaluación de los posibles efectos adversos provocados y la evolución de estos en el Instituto Finlay. Lo cual creemos que sirva y sea útil para aplicar a otros centros que se dedican a la búsqueda, investigación y registro de vacunas.

Desarrollo

Estudios preclínicos en general llevan

✚ Estudios Farmacológicos:

- ✓ Farmacodinamia primaria (inmunogenicidad y protección)
- ✓ Farmacodinamia secundaria (Farmacología de seguridad)
- ✓ Farmacocinética

✚ Estudios Toxicológicos:

- ✓ Toxicidad a dosis única
- ✓ Toxicidad por dosis repetida
- ✓ Tolerancia local
- ✓ Estudios de los tres segmentos de la reproducción (ya que son productos que se administran durante la vida de un individuo que incluye la etapa reproductiva del mismo)
- ✓ Potencial mutagénico y carcinogénico (no necesarios generalmente)

Los estudios toxicológicos se clasifican en:

Toxicología general: su objetivo es demostrar cualquier tipo de efecto tóxico que afecte morfológica o funcionalmente a los distintos órganos o sistemas del individuo.⁴

Toxicología especial: son aquellos estudios que se clasifican en función del efecto que se quiere investigar ya sea por el órgano (Ej. hepatotoxicidad) o sistema (Ej. neurotoxicidad) que se estudia o por el tipo de daño (irritabilidad, carcinogenicidad).

Para estos ensayos se emplean ratas Sprague-Dawley de 120-150g, de ambos sexos. Las formulaciones definitivas de los productos se administra según la vía propuesta para uso clínico, por ejemplo se aplica un volumen de 0.3 mL IM que es el máximo permisible para las

ratas de esta categoría. En el estudio se incluyen grupos de animales que son tratados con el producto completo, con las sustancias auxiliares y grupos que no son tratados.³

Se incluyen animales adicionales en el grupo tratado con la vacuna (centinelas) que se mantienen durante un tiempo mayor para estudiar la regresión de las lesiones en caso de presentarse.

Ejemplo de diseño de los grupos en ensayo: Ver Tabla 1

Se realiza la exploración clínica de los animales dos veces al día en las primeras 72 h de la administración y cada vez que se administre, luego diariamente durante todo el estudio, prestando especial atención a la manifestación de los síntomas siguientes: ⁵

- Claudicación
- Inflamación del punto de inoculación
- Piloerección
- Postración
- Movimientos involuntarios
 - Ataxia
 - Salivación
 - Lagrimeo
 - Excitación
 - Incoordinación

No obstante, se registra cualquier otro síntoma observado.

Peso corporal: Los animales son pesados al comienzo y fin del período de adaptación en aras de seleccionar aquellos que participarán en el estudio. Así mismo, se realizan pesajes sistemáticos a todos los animales sobrevivientes según diseño experimental para cada estudio en particular, después de realizada la inoculación.⁶

Consumo de agua: El agua se suministra *ad libitum* y se registra el volumen consumido tres veces por semana. Para ello se depositan 750 mL de agua en cada frasco para agua colocado a cada caja de ratas. El remanente de agua se calcula, por diferencia, el volumen consumido por el grupo. Para el cálculo del consumo medio diario por animal esta diferencia se divide por el número de animales en la caja y el número de días transcurridos desde la última medición.⁷

Consumo de alimentos: El consumo de alimentos se mide de un modo similar al de agua, con la excepción de que al inicio y cada vez que se haga una medición se llenan las tolvas de las cajas con 500 g de pienso. Con ayuda de una balanza técnica se pesa el alimento remanente y se calcula el consumo medio diario por animal como se describió para el agua.⁸

Estudio anatomopatológico: Los animales muertos durante el estudio y en estado agónico durante el período de evaluación son sometidos inmediatamente a necropsia. El sacrificio se realiza por exanguinación previa anestesia en atmósfera de éter. Por ejemplo para una DU de vacuna IM se examinan todos los órganos de todos los animales, se toman muestras del músculo a nivel punto de inoculación, los ganglios linfáticos poplíteo derecho e inguinal profundo derecho con el objetivo de realizarles estudios histopatológicos. Así mismo, se muestrean todos aquellos órganos que muestren alguna alteración al análisis macroscópico. El examen histopatológico comprende la tinción de hematoxilina-eosina, coloraciones especiales de Van-Giesson, PAS, Oil Red, Orseína.⁹

Propuesto de un procedimiento estadístico:

Los incrementos de peso se comparan mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación triple (tratamiento x sexo x vía), y el consumo de agua y alimento, mediante ANOVA múltiple con mediciones repetidas (tratamiento x sexo x vía x semana). En los casos en que el ANOVA sea significativo, por lo general se aplica la prueba de Duncan para determinar la diferencia entre medias. También se estudian las interacciones entre tratamientos, sexos y vías de administración. La frecuencia de lesiones en los grupos tratados y los controles se compara mediante la prueba de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ se consideran significativos estadísticamente.

Diseño para cada estudio en particular:

1. Toxicidad por Dosis Única (toxicidad aguda describe los efectos adversos que son el resultado de una sola exposición a una sustancia). En caso necesario se realizará a intervalos repetidos en el lapso de 24 h fundamentalmente.

Objetivo: Evaluar efecto tóxico de una sola dosis. Además se estudia la influencia del sexo.

Caracterización del biomodelo si se incluyen estudios inmunológicos.⁷⁻⁹

- Diseño: ^{3,10}

- Especie: generalmente solo una.
- Sexo: hembras y machos.
- n: 10 de cada sexo.
- Niveles de dosis: uno solo, dosis humana o máximo volumen permisible por la vía de administración utilizada. Rara vez un nivel adicional (dosis farmacológica, capaz de inducir respuesta inmune medible). Si se observan reacciones adversas se separa cada componente vacunal con un grupo de animales y ver en cual hubo reacciones adversas incluso se repite el grupo con la formulación vacunal completa
- Número de dosis: una.
- Vía: propuesta para uso humano.
- Duración: 14 días (excluyendo el tiempo de cuarentena).
- Variables: peso (semanal), consumo (diario o días alternos y previo al sacrificio), clínica (diaria), necropsia a 100% de los animales e histopatología del punto de inoculación, ganglios regionales y órganos que muestren lesiones macroscópicas.

2. Toxicidad por Dosis Repetida (toxicidad crónica que describe la acción tóxica de la sustancia en exposiciones repetidas en un periodo de tiempo más largo (varios meses).

Objetivo: Evaluar efecto tóxico de la administración reiterada. Puede revelar efectos acumulativos y órganos diana. Se combina con estudios de inmunogenicidad. Se trata de replicar el esquema propuesto en humanos, maximizando la exposición con una aplicación adicional.¹¹

- Diseño: ¹¹

- Especie: Una generalmente.
- Sexo: hembras y machos.
- n: 10 por sexo y tiempo de sacrificio.
- Niveles de dosis: Uno (dosis humana o volumen máximo permisible) o dos (rara vez).
- Número de dosis: Esquema propuesto para humanos más una.

- Frecuencia: episódica (nunca diaria, vg.: cada 2 semanas, similar a la usada en humanos, teniendo en cuenta la longevidad de la especie).
- Vía: la propuesta para uso humano.
- Duración: Según el esquema propuesto para la vacunación en humanos, puede contraerse según la respuesta inmune en el modelo animal.
- Variables:¹²
 - ✓ Peso (semanal), consumo (diario, c/2 días), clínica (diaria).
 - ✓ Anatomopatología (100%, dos tiempos de sacrificio) incluyendo todos los órganos (énfasis en sistema inmune y reproductivo).
 - ✓ Pesos de órganos.
 - ✓ Hematología y hemoquímica (función hepática, renal fundamentalmente y otras).
 - ✓ Inmunología: muestreo periódico durante el ensayo. Respuesta humoral (sangre, saliva, lavados vaginales) y celular (citoquinas intracelulares). Justifica el modelo, confirma la inoculación, prueba de concepto para la vacuna.
- Tiempos de sacrificio: 24-72 h y 2-4 semanas después de la última dosis.

Observaciones:^{12,13}

- Síntomas clínicos (2 veces/día y diarios).
- Peso vivo: adaptación, tiempo cero, intervalos semanales.
- Consumo de agua y pienso: 3 veces por semana.
- Estudios anatomopatológicos: 50 % del total de animales en cada sacrificio, después de la última inoculación.

Estudios especiales:

3. Tolerancia Local.

Objetivo: Evaluar efecto tóxico en el sitio de administración y la regresión de las lesiones en caso de producirse. Mayores exigencias para vacunas de administración parenteral. La prueba de tolerancia local tiene como objetivo evaluar el daño local provocado por la administración de un medicamento. Es importante, no obstante, que el investigador sea capaz de discernir

entre el daño tisular causado por efectos puramente físicos (temperatura, volumen de muestra, método de administración) o químicos (pH, corrosividad) de los efectos fármaco-toxicológicos.^{3, 10}

-Diseño: ^{3, 10, 13}

- Especie: Una.
- Sexo: hembras y machos.
- Niveles de dosis: Uno (dosis humana o volumen máximo permisible) o dos (rara vez).
- Número de dosis: Las concebidas en el esquema para humanos.
- Vía: la propuesta para uso humano.
- Duración: Según el esquema propuesto, puede contraerse.
- Variables: peso, consumo, clínica. Sacrificio seriado y examen anatomopatológico en el 100% de los animales, muestreo en el sitio de inoculación, ganglios linfáticos regionales y demás órganos que muestren alguna alteración.
- Volumen: Máximo permisible (dependiendo de la vía de administración).

Observaciones: ¹⁴

- Síntomas clínicos (2 veces/día, generales y locales).
- Peso vivo: semanalmente.
- Consumo de agua y pienso: 3 veces por semana.
- Estudios anatomopatológicos: del punto de inoculación fundamentalmente y los órganos que muestren alteración.

4. Toxicología de la Reproducción.

Segmento I, estudio de fertilidad y la función reproductiva en ambos sexos.

Especie animal: rata.

Se evalúan: ¹⁵

- × Efectos tóxicos sobre la gametogénesis, ovulación, implantación, homeostasis materna, transporte pre-embriionario, apareo.
- × El comportamiento en el apareo
- × Índice de fertilidad

- ✖ Los estadios de desarrollo durante la gestación, el parto, la lactancia y el crecimiento de las crías.

Segmento II, estudio de la toxicidad del desarrollo.

Especies: rata y conejo.

Se evalúan: ¹⁶

- ✖ Estudio de toxicidad del desarrollo embrio-fetal.
- ✖ Se administran los animales preñados durante la organogénesis
- ✖ Se examinan los úteros, se registra el; número y colocación de las implantaciones, reabsorciones tempranas y tardías, fetos vivos y muertos.
- ✖ Se examina el número de cuerpos lúteos en ovarios.
- ✖ Fetos pesado y se examinan malformaciones externas, viscerales y esqueléticas.

Segmento III, estudios perinatales y postnatales, desarrollo fetal tardío, lactancia y sobrevivencia.

Se evalúan: ¹⁷

- ✖ Estudia los estadios tardíos de la gestación, parto y la lactancia.
- ✖ El producto se administra durante todas estas etapas hasta el día 21 de la lactancia en ratas.
- ✖ Se monitorea el parto y el desarrollo de las crías, longitud de la gestación, mortalidad postnatal y daños en el comportamiento materno.

No obstante en las Conferencias Internacionales de Armonización (ICH). Se propuso en 1995 aprobar la guía "Detección de Toxicidad para la Reproducción de Productos Medicinales", ya que elimina el solapamiento entre los estudios y se sugiere una combinación de estudios:

- ❖ Fertilidad y desarrollo embrionario temprano.
- ❖ Desarrollo embrio-fetal.
- ❖ Desarrollo prenatal y postnatal, incluyendo la función materna.

Otras consideraciones acerca de los estudios reproductivos

- ✓ Estudios de función reproductiva (fertilidad): Generalmente no necesarios en vacunas. La histopatología durante los estudios de toxicidad general pueden

aportar suficientes elementos sobre la integridad de los órganos reproductivos.

Miden la afectación de este factor por medio del porcentaje de cópulas que llegan a diagnosticarse como ratas preñadas, preñez que alcanza su término, de recién nacidos que arriban a las 4 semanas de vida y otras variables.¹⁸

- ✓ Estudios de toxicidad embriofetal y perinatal: Son requeridos cuando la vacuna va a aplicarse a mujeres durante la preñez o edad reproductiva.¹⁹

- Diseño:

- ✓ Especies: Una relevante inmunológicamente. Si no existe un biomodelo "ideal", es útil, de todos modos, porque permite evaluar la toxicidad intrínseca de la vacuna en el animal gestante.
- ✓ Dosis: Útil para definir:²⁰
 - Dosis que provoque efectos tóxicos potenciales sobre la madre o el *conceptus*.
 - Dosis segura.
 - Dosis capaz de generar respuesta inmune.
- ✓ Esquema: basado en el propuesto para humanos (episódico). Según la cinética de anticuerpos y la duración de la gestación, puede ser necesaria una dosis antes de la concepción. Así mismo, debe aplicarse la vacuna durante la organogénesis.²¹
- ✓ Seguimiento: Desde la implantación hasta el parto y desde este hasta el destete.

Tabla 1. Propuesta de un diseño experimental.

Grupos	Tratamiento
I	Control No Tratado
II	Placebo
III	Vacuna en estudio
IV*	Vacuna en estudio Centinela

*Extensión del grupo III

Referencias Bibliográficas

1. Arencibia D.F, Rosario L.A, López Y, Fariñas M, Infante J.F, Díaz D, Prieto J.L. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *retel* (revista de toxicología en línea) 2009; 22(1):1-15.
2. Jessop J. The IND (Investigational New Drug) Application: Is our Product Safe to Administer in the Clinic? *Global Outsourcing. Review* 2003; 5(2):3-4.
3. Núñez J.F, Herrera L, Infante J.F, González P, Pérez V. Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2006; 15(2):5-6.
4. Markey C.M. The development of Acute Toxicity in mouse study. *Biol. Repro* 2001; 65:1215-1223.
5. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline no. 425: Acute Oral Toxicity– Up-and-Down Method. Approved: June 1998. (Definitions for reference dose and threshold); 1998.p.6-8.
6. Alemán C, Mesa R, Noa M, Rodeiro I, Menéndez R, Gamez R. Toxicología aguda del D-002 en dos especies no roedoras. *Rev. CENIC Cien. Biol* 2001; 32(1):51-55.
7. Auletta C. Acute Systemic Toxicity Testing. In: *Product Safety Evaluation Handbook*: Ed. Gad S.C.; Ed. Marcel Dekker, Inc. U.S; 1999.p.43-86.
8. Gámez R, Más R, Noa M, Menendez R. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. *Toxicol Letters* 2000; 118:31-41.
9. Clemedson C, McFarlane-Abdulla E, Andersson M. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. *ATLA* 1999; 24:273-311.
10. Infante J.F, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E, Fariñas M. Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2004; 13(2):6-8.
11. ICH. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Step 4 on 16 July 1997. CPMP/ ICH/302/95.1997.p.5-6.
12. EMEA. Note for Guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99.2001.p.3-7.

13. EMEA. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. CPMP/SWP/465/95.1997.p.12-14.
14. Sosa E, Sifontes S, Infante J.F, Díaz D, López Y. Estudio de tolerancia local de la vacuna vax-TyVi en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2005; 14(1):8-11.
15. Arencibia D.F, Rosario L.A, López Y, Infante J.F, Fariñas M, Díaz D. Algunas consideraciones sobre el uso de modelos animal en el ensayo de teratogénesis. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 21(2):22-36.
16. Arencibia D.F, Rosario L.A, López Y, Ortiz L, Curveco D. Evaluación del desarrollo físico y funcional en ratas recién nacidas para su uso en estudios de toxicología perinatal y postnatal. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 22(2):16-28.
17. Simister N.E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003; 21:3365-3369.
18. Siegrist C.A. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 2001; 19:3331-3346.
19. Gruber M.F. Maternal immunization: US FDA regulatory considerations. *Vaccine* 2003; 21:3487-3491.
20. Barrow P.C. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. *Toxicol* 2003; 185:205-212.
21. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21:471-495.

Recibida 27/11/09

Aprobado: 17/12/09