

Evaluación toxicológica del anticuerpo monoclonal IOR C5 en administraciones reiteradas en ratas hembras

✉ Rita M Pérez, José L Bello, Juan C Rodríguez, Carlos F Calderón, Ana D Ávila, Martha Montalvo, Ricardo Martínez

Departamento de Investigaciones Preclínicas. Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales. Instituto de Oncología y Radiobiología. Calle 29 y E, El Vedado. AP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba. Telf: (53-7) 55 2586; Fax: (53-7) 55 2584; E-mail: rpgil@oncofa.sld.cu

RESUMEN

Para la realización de diagnósticos inmunogammagráficos, los anticuerpos monoclonales (AcM) se administran en una dosis única al paciente, por lo que los estudios sobre los efectos de toxicidad después de varias administraciones se realizan durante períodos relativamente cortos. En este trabajo se evalúa la toxicidad del AcM IOR C5, propuesto para el diagnóstico de lesiones colorrectales en 15 administraciones reiteradas a ratas Sprague Dawley. Se evaluaron tres niveles de dosis: 0,11; 1,10 y 2,75 mg/kg. El AcM IOR C5 se administró por vía endovenosa. El peso corporal y el consumo de agua y alimentos, se registraron semanalmente después de la administración del AcM IOR C5. Se realizaron dos muestreos: el primero, al día siguiente de la última administración, y el segundo, transcurridos 14 días. Se determinaron algunos índices hematológicos y bioquímicos, incluidos los niveles de las enzimas aspartato-amino-transferasa y alanina-amino-transferasa en suero, sin que se encontraran efectos de toxicidad atribuibles a la administración del producto. Se realizaron los estudios anatomopatológico (por inspección macroscópica) e histopatológico del hígado, el bazo, los riñones, el estómago, el corazón, el intestino delgado (duodeno-yeyuno-íleon) y los pulmones. La inspección de los órganos no evidenció alteraciones macroscópicas. Según los resultados del estudio histopatológico, no se observaron diferencias entre el grupo control y el de la dosis máxima del ensayo (2,75 mg/kg de peso). Las lesiones no fueron específicas de un grupo porque se presentaron aleatoriamente en ambos grupos, por lo que se puede decir que su aparición no está relacionada con el tratamiento. La administración reiterada del AcM IOR-C5 en forma liofilizada por vía endovenosa, no produce alteraciones que puedan atribuirse a efectos tóxicos en las ratas.

Palabras claves: administraciones repetidas, ALAT, anticuerpos monoclonales, ASAT, ratas Sprague Dawley, toxicidad

Biotecnología Aplicada 2000;17:30-33

ABSTRACT

Toxicological Evaluation by Reiterated Administrations of IOR C5 Monoclonal Antibody in Female Rats.

To carry out immunogammagraphic diagnosis, monoclonal antibodies (MAbs) are administered to patients in a single dose. For this reason, the studies of their toxic effects after several administrations are carried out for relatively short periods. The objective of this work was to evaluate the toxicity of the MAb IOR C5 proposed for the diagnosis of colorectal lesions in 15 reiterated administrations to Sprague Dawley rats. Three dose levels of 0.11, 1.10 and 2.75 mg/kg of weight were evaluated. MAb IOR C5 was administered intravenously. Body weight was registered weekly after the administration of MAb IOR C5, as well as the consumption of water and food. Two samplings were carried out. The first was taken the day after the last administration, and the second one 14 days later. Hematological and biochemical indexes were determined, including the levels of the serum enzymes aspartate-amino transferase and alanine-amino transferase. Toxicity effects are not to be attributed to the administration of the product. An anatomopathological macroscopic study was carried out in liver, spleen, kidneys, stomach, heart, small intestine (duodenum-jejunum-ileum), and lungs, as well as their histological study. Organ inspection did not evidence macroscopic alterations. No differences were observed between the control group and that of the maximal dose (2.75 mg/kg). Lesions were not specific of any group, and they were randomly present in both groups. For this reason, we can say that they are not related to treatment. The reiterated intravenous administration of MAb IOR C5 in freeze-dried form does not cause alterations that can be attributed to toxic effects in rats.

Keywords: ALAT, ASAT, monoclonal antibodies, reiterated administration, Sprague Dawley rats, toxicity

Introducción

Las características peculiares de los preparados biofarmacéuticos, han hecho que se necesiten regulaciones y recomendaciones especialmente diseñadas para su evaluación preclínica. Estas regulaciones han sido el resultado del análisis de la experiencia acumulada en el proceso de desarrollo de medicamentos de este tipo [1-5].

En las evaluaciones preclínicas de la toxicidad de los anticuerpos monoclonales (AcM) y otros productos biotecnológicos, se plantea la necesidad de hacer

una selección adecuada del modelo animal para la realización del estudio, así como de tener en cuenta la edad de los animales que se van a utilizar, sus condiciones fisiológicas, las dosis que se van a administrar, la vía y el régimen de administración [6].

Debido a su especificidad por los antígenos presentes en la células tumorales, los AcM han sido usados en la generación de radiofármacos para el diagnóstico y el seguimiento de pacientes con enfermedades malignas. La inmunogammagrafía surgió de esta forma [7, 8].

1. Comunidad Europea. Pruebas preclínicas sobre la seguridad biológica de los medicamentos obtenidos mediante la biotecnología. Normas sobre medicamentos de la Comunidad Europea Vol III, Bruselas-Luxemburgo, 1989:73-88.

2. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Pre-clinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. Editado por: ICH Steering Committee. 16-18 de Julio, Bruselas, 1997.

Los AcM empleados en estudios inmunogammagráficos deben ser evaluados como medicamentos porque se administran al hombre por la vía parenteral. Para la realización de diagnósticos con esta tecnología, el AcM se administra al paciente en una dosis única, razón por la cual los estudios acerca de la aparición de efectos colaterales indeseables después de varias administraciones, se realizan durante períodos relativamente cortos [9].

Desde el año 1990, en el Departamento de Investigaciones Preclínicas del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR, La Habana, Cuba), se han acumulado experiencias en la evaluación preclínica de AcM con vistas a su registro como medicamentos, ya sea para su uso en el diagnóstico o para la terapia del cáncer. Es dentro de esta temática que se inserta el objetivo de este trabajo, que consiste en la evaluación de la toxicidad del AcM IOR C5 en ratas Sprague Dawley hembras, después de administraciones sucesivas durante 15 días. El AcM IOR C5 está propuesto para su uso en estudios inmunogammagráficos para el diagnóstico de lesiones colorrectales.

Materiales y Métodos

Se utilizó como sustancia de ensayo la formulación liofilizada del AcM IOR C5 lote 9602, que fue suministrada por el Centro de Inmunología Molecular (CIM, La Habana, Cuba). En este centro se produce el AcM IOR C5 con calidad de inyectable para su uso en humanos. El producto liofilizado es presentado en bulbos con la siguiente composición: 1 mg de AcM IOR C5; 50 µg de metilendisulfonato (MDP); 3,4 µg de cloruro de estaño (SnCl₂); 20 µg de ácido aminobenzoico y 10 mg de glucosa. El anticuerpo liofilizado se reconstituyó en 1 mL de solución salina fisiológica a una concentración de 1 mg/mL. Como sustancia de referencia se empleó solución salina fisiológica.

Diseño experimental

Modelo animal de ensayo y formación de los grupos experimentales. Como no se encontraron efectos tóxicos en las ratas para ambos sexos cuando se evaluó la toxicidad aguda de este anticuerpo, en la realización del ensayo se utilizaron ratas hembras pertenecientes a una sublínea del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), producida a partir de la línea Sprague Dawley. Los animales, con pesos corporales comprendidos entre 174,86 g y 188,99 g, se distribuyeron al azar para formar 4 grupos de ensayo de 8 animales cada uno, suficientes para realizar los estudios al concluir la administración del producto y al finalizar el período de observación [9]. Los animales se mantuvieron en cajas plásticas T₄ con lecho de bagazo de caña prensado y esterilizado, a razón de 4 animales por caja durante los 6 días correspondientes al período de adaptación y en la realización del ensayo. Las condiciones de mantenimiento fueron las normadas para esta especie [10]. Los animales fueron identificados mediante tinción con ácido pícrico. Las ratas fueron alimentadas con pienso proveniente del CENPALAB. La comida y el agua de beber se suministraron *ad libitum*. En cada caja, se colocaron 500 g de pienso y 500 mL de agua, y su consumo se controló cada 3 días.

La temperatura en el local de permanencia de los animales durante el ensayo, se mantuvo entre 21 °C y 25 °C, y la humedad entre 55% y 65%. Las condiciones de extracción del aire garantizaron diez cambios de aire por hora y los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12 h por día.

Selección de las dosis de ensayo. La dosis propuesta para uso en humanos fue de 1 mg, lo que corresponde a 0,67 mg/m² de superficie corporal. La dosis equivalente para la rata es de 0,11 mg/kg de peso [11].

Se evaluaron tres niveles de dosis: el equivalente a la dosis propuesta para los humanos, y 10 y 25 veces este valor; o sea, que las dosis del ensayo fueron 0,11; 1,10 y 2,75 mg/kg de peso.

Administración del AcM IOR C5. El AcM IOR C5 se administró a las ratas por la vía endovenosa (mediante punción de la vena marginal de la cola), por ser ésta es la forma de administración propuesta para los humanos. El AcM IOR C5 fue administrado diariamente a cada uno de los grupos en las dosis respectivas, entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana durante 15 días, teniendo en cuenta las variaciones semanales del peso. Cada uno de los animales pertenecientes al grupo control recibió 0,25 mL de solución salina fisiológica.

Observaciones clínicas

Una vez administrado el producto, las ratas fueron observadas con el propósito de registrar alteraciones en su comportamiento o la aparición de mortalidad. Estas observaciones se realizaron tanto en el período de administración del producto, como en el período de observación después del tratamiento. El peso corporal se registró semanalmente a partir de la administración del AcM IOR C5.

Al día siguiente de la última administración, se procedió a sacrificar la mitad de los animales (primer muestreo), con vistas a evaluar algunos índices fisiológicos las posibles alteraciones anatomopatológicas que pudieran manifestarse de forma macroscópica. Transcurridos 14 días después de la última administración, se sacrificó el resto de los animales (segundo muestreo), con vistas a valorar alteraciones tardías. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Determinación de índices hematológicos y bioquímicos

Una vez concluidos los dos muestreos, se determinaron algunos índices hematológicos y bioquímicos: hematocrito, trombocitos, leucocitos, conteo diferencial, colesterol, glicemia, proteínas totales, creatinina, así como los niveles de las enzimas alanina-amino-transferasa (ALAT) y aspartato-amino-transferasa (ASAT) en el suero [12].

La extracción de sangre se realizó durante los muestreos a través de la vena femoral de las ratas, las cuales fueron previamente anestesiadas con éter.

Análisis anatomopatológico

Durante las necropsias, se realizó la descripción macroscópica de los órganos extraídos y se registró su peso. Se extrajeron el hígado, el bazo, los riñones, el estómago, el corazón, el intestino delgado (duodeno-yeyuno-íleon) y los pulmones. Las muestras extraídas de las necropsias se conservaron en formol 10%,

3. CECMED. Requisitos para la solicitud de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de uso humano, 1996.

4. FDA Office of Biological Research and Review Center for Drugs and Biologicals Points to consider in the manufacture and testing for monoclonal antibodies products for human uses. EUA; 1987.

5. Cavagnaro J. Safety evaluation of biotechnology products. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, 1995:3-8.

6. Dorato MA, Vodcnik MJ. The toxicology assessment of pharmaceutical and biotechnology products. In: Wallace Hayes, editor. Principles and Methods of Toxicology, Raven Press, New York. 1994: 189-96.

7. Oliva JP, Peralta R, Choy J, Pimentel G, Cassola J, Valdés H, et al. IOR-CEA-1: un nuevo anticuerpo monoclonal anti-CEA para la inmunogammagrafía de los tumores colorrectales. Resultados preliminares. Rev Esp Med Nuclear 1994;13(1):32-7.

8. Oliva JP, Pimentel G, Cascante L, Peralta R, Borrón M, Ortiz R, et al. IOR-CEA-1: Un nuevo anticuerpo monoclonal anti-CEA marcado con ^{99m}Tc para la inmunogammagrafía de los tumores colorrectales. Resultados finales de un ensayo clínico fase I-II. Rev Esp Med Nuclear 1995; 14(4): 213-21.

9. Comunidad Europea. Pruebas preclínicas sobre la seguridad biológica de los medicamentos obtenidos mediante la biotecnología. Toxicidad para administración continuada. Normas sobre medicamentos de la Comunidad Europea Vol III. Editorial: Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas, Luxemburgo, 1989: 89-94.

10. Comunidad Económica Europea. Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales. Diario oficial de las Comunidades Europeas, Editor CEE, Directiva 86/609/CEE. Anexo II 1986:95-102.

11. Sirkin AB, Juskov SF, Zajčeva LA. Preclinical toxicology of anticancer drugs. Antitumor Therapy Reports 1984; 10(3):5-8.

12. Manual de técnicas para laboratorio clínico. Grupo Nacional de Laboratorios Clínicos (MINSAP). La Habana: Editorial Ciencia y Técnica (ICL); 1969. p.27-75.

se incluyeron en parafina y se cortaron en un micrótopo (820 Spencer, American Optical Corp, Estados Unidos), con un grosor de 4 a 5 mm. Se usó la técnica tradicional de coloración con hematoxilina-eosina para la realización de los estudios de histopatología.

Durante la realización del ensayo, se observó el estricto cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de la Calidad [13].

Análisis estadístico

Se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar para los índices fisiológicos y las otras variables estudiadas. La comparación entre los grupos experimentales para la búsqueda de diferencias estadísticamente significativas, se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con el auxilio del programa SPSS para Windows (SPSS release 5.0.1 octubre 09/1992 Microsoft Corp.), con un nivel de significación de 95%.

Resultados y Discusión

No se registró mortalidad en ninguno de los grupos experimentales. Los animales tratados con las diferentes dosis del AcM IOR C5 y los del grupo control, no mostraron alteraciones en el examen clínico y su comportamiento fue normal.

Como se puede observar en la Tabla 1, no hubo diferencias significativas en el peso corporal en el intervalo de tiempo (semana 0 a la semana 4) en que se determinó esta variable.

Al estudiar las manifestaciones de toxicidad del producto a través de la evaluación de los índices hematológicos y bioquímicos de la sangre, incluidos los niveles de las enzimas ALAT y ASAT en el suero, se observó que en el primer muestreo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y el grupo control, en relación con el conteo de trombocitos y leucocitos, el hematocrito y el contenido de hemoglobina (Tabla 2). A los 14 días de terminado el tratamiento, tampoco se detectaron diferencias entre los grupos en las determinaciones del contenido de hemoglobina, el conteo de trombocitos y los hematocritos (Tabla 2). En relación con los leucocitos, se detectaron diferencias entre los grupos, pero no se manifestaron como alteraciones de la fórmula hemática, que siempre fue la usual de la especie [14].

Para los índices bioquímicos sanguíneos evaluados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control en el primer y segundo muestreos (Tabla 3).

En el caso de los niveles en suero de las enzimas ALAT y ASAT, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el primer muestreo realizado. En el segundo muestreo (Tabla 3) se observaron diferencias entre los grupos, pero éstas no se deben a un efecto dependiente de la dosis. Estos valores están incluidos en el rango normal de variación de los índices fisiológicos de la especie, según los datos de laboratorio para la técnica de determinación de los niveles de estas enzimas en suero, y según los reportes que aparecen en la literatura [14]. Como se puede apreciar, los índices hematológicos y bioquímicos no muestran diferencias entre los grupos de experimentación que puedan ser atribuidas al pro-

Tabla 1. Variación del peso corporal de ratas tratadas con el AcM IOR C5 liofilizado. Se reportan los valores de las medias aritméticas para cada grupo y las respectivas desviaciones estándar. No existen diferencias significativas entre los grupos tratados con el AcM IOR C5 y el grupo control ($p < 0,05$).

Dosis (mg/kg)	Peso inicial	Días después de la administración de la dosis			
		7	14	21	28
2,75	188,99 ± 15,47	227,75 ± 18,67	231,78 ± 18,64	273,03 ± 18,69	248,00 ± 13,64
1,10	180,89 ± 10,59	214,31 ± 6,88	226,69 ± 5,96	241,05 ± 4,12	174,86 ± 10,55
0,11	174,86 ± 10,55	202,55 ± 9,83	217,15 ± 17,50	227,63 ± 18,39	231,10 ± 2,29
Control	175,30 ± 14,09	213,79 ± 15,84	235,71 ± 23,69	252,15 ± 15,17	227,53 ± 10,87

Tabla 2. Índices hematológicos de ratas Sprague Dawley hembras tratadas con el AcM IOR C5 liofilizado. (Se reporta media aritmética ± desviación estándar, $n = 4$).

Dosis (mg/kg)	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Trombocitos ($\times 10^9/L$)	Hemoglobina (g/L)	Hematocrito	Linfocitos	Polimorfos
Primer muestreo						
2,75	8,43 ± 2,32	491,25 ± 134,81	159,8 ± 1,03	0,47 ± 0,04	0,84 ± 0,05	0,08 ± 0,02
1,10	9,93 ± 1,98	647,25 ± 189,71	146,5 ± 1,10	0,44 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,08 ± 0,04
0,11	9,43 ± 1,30	739,50 ± 96,35	143,8 ± 1,60	0,43 ± 0,04	0,93 ± 0,07	0,04 ± 0,04
Control	± 1,44	613,75 ± 122,30	142,8 ± 0,38	0,43 ± 0,02	0,89 ± 0,05	0,09 ± 0,05
Segundo muestreo						
2,75	11,58 ± 1,30	703,75 ± 77,00	174,7 ± 0,92	0,48 ± 0,01	0,83 ± 0,06	0,12 ± 0,01
1,10	11,83 ± 1,96	603,75 ± 240,00	169,2 ± 0,53	0,48 ± 0,01	0,85 ± 0,07	0,14 ± 0,07
0,11	11,70 ± 1,60	510,00 ± 69,16	153,8 ± 0,15	0,46 ± 0,01	0,77 ± 0,06	0,16 ± 0,06
Control	10,80 ± 0,91	632,75 ± 240,00	161,8 ± 0,50	0,48 ± 0,02	0,86 ± 0,05	0,11 ± 0,04

Tabla 3. Índices bioquímicos de la sangre y niveles de las enzimas ALAT y ASAT en el suero de ratas Sprague Dawley hembras tratadas con el AcM IOR C5 liofilizado. (Se reporta media aritmética ± desviación estándar, $n = 4$).

Dosis (mg/kg de peso)	Proteínas totales (g/L)	Creatinina ($\mu\text{moles/L}$)	Glucosa (mmoles/L)	Colesterol (mmoles/L)	ALAT (UI/L)	ASAT (UI/L)
Primer muestreo						
2,75	61,90 ± 14,34	74,00 ± 11,60	11,10 ± 0,28	1,64 ± 0,21	24,33 ± 13,82	36,67 ± 3,06
1,10	63,80 ± 8,57	102,25 ± 58,67	9,38 ± 1,42	1,59 ± 0,21	25,50 ± 6,61	37,00 ± 5,29
0,11	58,33 ± 7,58	77,15 ± 7,23	12,70 ± 2,46	1,49 ± 0,35	21,25 ± 4,35	34,25 ± 3,86
Control	64,22 ± 10,99	69,50 ± 7,37	12,10 ± 0,94	1,80 ± 0,21	21,75 ± 3,99	32,25 ± 2,22
Segundo muestreo						
2,75		108,78 ± 49,03	5,95 ± 1,40	2,05 ± 0,10	12,41 ± 1,82	42,75 ± 4,43
1,10	No determinado	80,00 ± 22,18	9,07 ± 2,02	1,90 ± 0,26	19,75 ± 3,10	52,50 ± 5,20
0,11		85,38 ± 45,68	9,17 ± 3,63	1,87 ± 0,32	21,00 ± 1,41	46,25 ± 2,99
Control		82,25 ± 40,82	10,45 ± 3,07	2,02 ± 0,15	13,25 ± 2,50	51,21 ± 3,59

ducto. En los casos en que se manifestaron diferencias significativas, los valores obtenidos nunca se alejaron de los marcos propios descritos para la especie. Tampoco hubo ningún efecto de dependencia de la dosis que pudiera estar relacionado con la administración del producto.

Estudio anatomopatológico

Las observaciones anatomopatológicas —que consistieron en la inspección externa y macroscópica de los órganos—, no mostraron la existencia de alteraciones que pudieran relacionarse con el tratamiento con el AcM IOR C5. El análisis de los pesos relativos de los órganos, tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En algunos animales se observaron alteraciones en la zona de inyección; sin embargo, la aparición de estas lesiones no fue atribuible a un efecto dependiente de la dosis, pues éstas aparecieron de forma cualitativamente similar en todos los grupos experimentales y en el grupo control. Entonces, se puede afirmar que el

13. MINSAP. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de la Calidad en Ensayos Toxicológicos. ECIMED; 1993

14. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Hematology and Clinical Biochemistry Reference Values. In: Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. Ottawa (Canadá): CCAC Publishing House; 1984. p.86-8.

motivo de aparición de estas alteraciones fue la continua manipulación en el área de inyección, durante los 15 días de administración del AcM IOR C5. Los hallazgos congestivos o hiperémicos observados se pueden relacionar con el proceso de sacrificio del animal.

Según los resultados del estudio histopatológico, no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo de la dosis máxima del ensayo (2,75 mg/kg de peso).

En ambos grupos se observaron lesiones como nefrocalcinosis y proliferación a nivel de los tabiques alveolares (neumonía alveolar proliferativa). La primera afección es frecuente en los animales de laboratorio y es considerada un trastorno espontáneo muy frecuente en las ratas hembras, el cual está relacionado con diferencias en el contenido de minerales de la dieta, principalmente calcio y fósforo. La neumonía alveolar proliferativa puede deberse a enfermedades sistémicas en estos animales. No obstante, esta lesión también puede aparecer como respuesta a la inhalación del éter, que fue la sustancia empleada durante el sacrificio para anestesiarse a los animales.

Sin embargo, estas lesiones no fueron específicas de un grupo, sino que se presentaron aleatoriamente

en ambos grupos (control y dosis máxima), sin preferencia por alguno de ellos, por lo que se puede afirmar que su aparición no está relacionada con el tratamiento.

El AcM IOR C5 en forma liofilizada, administrado a las ratas hembras durante 15 días, no indujo manifestaciones de toxicidad en los animales tratados, y los órganos no evidenciaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas que puedan ser atribuidas al producto.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la administración reiterada (15 administraciones) del AcM IOR C5 en forma liofilizada por vía endovenosa, no produce alteraciones que puedan atribuirse a efectos tóxicos en ratas.

Agradecimientos

Deseamos agradecer el trabajo de Josué Rodríguez, Emilia Sánchez, María L Acevedo y Mylene Ramírez, técnicos del Laboratorio de Química y Toxicología, por su participación en el procesamiento de las muestras.

Recibido en mayo de 1998. Aprobado en agosto de 1999.