

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Estudio de Toxicidad por Dosis Única de la Vacuna Antimeningocócica ACW135 en Ratas Sprague Dawley

Mildrey Fariñas Medina, Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Daiyana Días Rivero, Juan Francisco Infante Bourzac, Yolanda Valdés Abreu, Tamara Hernández Salazar; Jorge Luis Prieto Días; Viviana Pérez Amat, Darien Cabrejas Lobaina, Niurka Rodríguez Pérez, Eligio Arturo Sosa Roble, Rosa Lydia Solis Rodriguez, Reynaldo Oliva Hernández*.

Institución: Instituto Finlay.

Dirección de Preclínica

Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo, Instituto Finlay. Avenida 17 e/198 y 200, Reparto Siboney, Municipio Playa, Habana. Cuba. Apartado Postal 16017.

*E-mail: roh@finlay.edu.cu; reyolivacuba@gmail.com

Resumen

La vacuna combinada de polisacáridos purificados de meningococo de los serogrupos A, C y W₁₃₅, es de nueva obtención y producción entre el Instituto Finlay, Cuba y el Instituto de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil. Para estudiar el potencial toxicológico de esta vacuna contra meningococos de estos serogrupos, se realizó un estudio de dosis única por vía intramuscular en ratas Sprague Dawley. Se administró un volumen de 0,2 mL de las sustancias de ensayo. Una vez tratados, los animales fueron observados diariamente en busca de síntomas locales y sistémicos de toxicidad durante 14 días. Se realizaron, además, mediciones del consumo de agua y alimento, así como del peso corporal. Los animales fueron eutanasiados cumpliendo con las exigencias éticas establecidas y sometidos a necropsia realizando estudios anatomopatológicos para observar posibles efectos adversos tras la inmunización con la vacuna en ensayo. No se observaron síntomas de toxicidad ni muertes durante el estudio en los animales. No se observaron síntomas clínicos adversos ni existieron diferencias de interés toxicológico entre los grupos experimentales en cuanto al peso corporal, el consumo de agua y de alimentos. En el estudio anatomopatológico no se observaron lesiones de valor diagnóstico. Estos resultados permitieron concluir que el candidato vacunal en estudio no evidenció producir ni síntomas clínicos, muertes, efectos adversos locales, ni sistémicos de tipo toxicológico en el modelo animal usado, al ser aplicado en dosis única.

Palabras claves. Toxicidad, dosis única, Vacuna Antimeningocócica ACW₁₃₅, ratas Sprague Dawley.

Abstract

Single Dose Toxicity Study of the ACW₁₃₅ Antimeningococcal Vaccine in Sprague Dawley Rats.

The combined vaccine of purified polysaccharides of the A, C and W₁₃₅ meningococcal serogroups, are of new obtaining and production among Finlay Institute, Cuba and Bio-Manguinhos/FIOCRUZ Institute, Brazil. To study the toxicological potential of this vaccine against meningococcal of these serogrupos, we were carried out a study of single dose toxicity via intramuscular in Sprague Dawley rats. Was administered 0,2 mL volume of the vaccine. Once treaties, the animals were observed daily in search of local and systemic symptoms of toxicity during 14 days. They were carried out, mensurations of water and food consumption, and the corporal weight. We performed the euthanasia to the animals fulfilling the established and subjected ethical demands to autopsy carrying out anatomopathologic studies to observe possible adverse effects after the immunization with the vaccine. Were not observed toxicity symptoms neither deaths during the study in the animals. There were not differences of toxicological interest among the experimental groups as for the corporal weight and the water and foods consumption. In the anatomopathological study lesions of value diagnosis were not observed. These results allowed to conclude that the vacunal candidate doesn't evidence to take place neither clinical symptoms, deaths, local adverse effects, neither systemic of toxicological type in the used animal model, when being applied in single dose.

Keywords: Toxicity, single dose, ACW₁₃₅ Antimeningococcal Vaccine, Sprague Dawley rats.

Introducción

La enfermedad meningocócica es una de las principales causas de meningitis bacteriana y septicemia en los países industrializados y en desarrollo, tiene una alta prevalencia a nivel mundial y existen numerosos lugares donde la enfermedad es endémica. Pudiéndose mencionar el cinturón de la meningitis en África, en Asia y algunos países de América también provoca afectaciones, sobre todo en las estaciones del año, secas y frías (1). La organización mundial de la salud prevé el riesgo de ocurrencia de una epidemia a gran escala en varios países (2,3).

El agente causal es una bacteria Gram-negativa: *Neisseria meningitidis*, capaz de colonizar asintóticamente el tracto respiratorio superior. Existen distintos tipos de meningococo, pero cinco serogrupos son los responsables de la mayoría de las infecciones: meningococo A, C, Y, W₁₃₅, y B. La incidencia de la distribución geográfica tanto de la enfermedad como de los serogrupos de la bacteria que la producen, cambian continuamente. Durante los últimos años se ha observado en diferentes regiones un aumento en la circulación del serotipo W₁₃₅ (4,5).

Por lo que teniendo en cuenta estos aspectos antes mencionados y a petición de la Organización Mundial de la Salud ante la realidad de las epidemias en el cinturón de la meningitis en África, el Instituto Finlay de Cuba en colaboración con el Instituto Bio-Manguinhos de Brasil, elaboró una vacuna liofilizada contra los serogrupos A, C, y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis*, que pudiera ayudar a revertir esta situación a nivel mundial; haciéndose necesario como paso previo a su uso seguro en humanos realizar los correspondientes estudios preclínicos toxicológicos de este candidato vacunal.

Para evaluar el potencial tóxico de este producto se realizó un estudio de toxicidad por dosis única. El diseño experimental contempló la inoculación intramuscular en ratas Sprague Dawley con 0,2 mL de la formulación vacunal y su placebo, incluyéndose en el ensayo los controles correspondientes. Los animales fueron observados durante 14 días. Este diseño se basó, fundamentalmente, en la información recopilada de la Resolución No. 152/92 MINSAP (6), las Pautas de la OECD para la Evaluación de Fármacos (7), los

Estándares de Medicamentos de la Comunidad Europea (8,9) y las normas de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (10), también fueron consultados otros documentos no citados.

Materiales y métodos

Modelo Animal.

Fueron utilizadas ratas Sprague Dawley (SD) de ambos sexos con una edad de 35-37 días y un peso vivo de 101 – 125 g (edad y peso de recepción) . Los mismos fueron suministrados por el CENPALAB, acompañados de sus certificados de calidad sanitaria. La rata es considerada la especie roedora de preferencia para este tipo de estudio y la línea SD está bien caracterizada y ha sido ampliamente usada por su gran sensibilidad en los estudios de toxicidad (11-13). Es, además, una línea no isogénica, por lo que puede dar una respuesta heterogénea, de mayor relevancia para la especie humana. Se considera que la rata SD constituye un modelo de relevancia potencial para la evaluación de la toxicidad intrínseca y asociada a la respuesta inmune de productos vacunales contra meningococos (14), además se ha usado en otros estudios toxicológicos de vacunas contra meningococos (15, 16).

Condiciones de alojamiento, adaptación y aleatorización.

Los animales fueron alojados en cajas tipo T4 (área de piso: 1800 cm²) de policarbonato (Tecniplast, Italia). Cinco animales de un mismo sexo fueron colocados por cajas. Se empleó encamado de bagazo de caña desmenuzado suministrado por el CENPALAB y esterilizado en autoclave durante 25 min. a 121 °C cambiándose dos veces por semana. La alimentación consistió en pienso especializado para ratas, suministrado y certificado por el CENPALAB y agua potable como bebida, ambos *ad libitum*. Los locales donde se mantuvieron los animales mantuvieron una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60 ± 5%. Estos parámetros fueron diariamente registrados manteniendo un ciclo de 10 h luz y 14 h oscuridad. Los animales utilizados en este

estudio se mantuvieron en adaptación antes del comienzo del experimento durante 7 a 10 días.

De tres a cuatro días después de la adaptación los animales fueron identificados y distribuidos aleatoriamente (técnica de doble ciega) en función de los grupos experimentales. Concluido el tiempo de adaptación se seleccionaron los animales necesarios de cada sexo para conformar los grupos experimentales. En dicha selección se tuvo en cuenta que los animales estuviesen clínicamente sanos, que los pesos fueran homogéneos y que fueran estadísticamente similares (análisis de varianza de clasificación doble – tratamiento x sexo - y Kruskal Wallis –tratamientos por sexos separados). Los tratamientos fueron asignados a los animales seleccionados de forma aleatoria.

Procedimiento Experimental.

Grupos de tratamiento y vía de administración.

En el ensayo se incluyeron animales no inmunizados que permitió no solo el control de las condiciones de inmunización, sino también de los posibles efectos adversos potenciales que pudieran desarrollarse en el curso del experimento. Se empleó la vía intramuscular por ser la propuesta para uso humano, en la región media posterior de la cara interna del muslo izquierdo, la misma se realizó en horas tempranas de la mañana, entre las 9:00 y las 11:00 a.m.

Estudio de Toxicidad por Dosis Única.

La dosis de vacuna propuesta para uso clínico en humanos es de 0,5 mL. El máximo permisible para ratas de estas tallas y pesos es un volumen de 0,2 mL (17, 18). Teniendo en cuenta el peso y las relaciones alométricas entre el hombre y el modelo experimental utilizado, la dosis a aplicar (0.2 mL) permitió evaluar un margen de seguridad satisfactorio.

El estudio de dosis única tuvo una duración de dos semanas (14 días), éstas no incluyeron el período de adaptación. Se formaron 3 grupos de tratamiento para cada estudio con el esquema de una única dosis. El estudio de dosis única tuvo la finalidad de

evaluar efectos adversos locales y sistémicos luego de la aplicación de una dosis del producto en prueba.

A diferencia de los fármacos clásicos, en el caso de las vacunas no es preciso hacer un estudio de dosis efecto, en cambio se administra la mayor dosis posible, en función del volumen máximo permisible según la vía de administración empleada. Idealmente, se administrará la máxima dosis propuesta a probar en humanos.

El diseño de los grupos experimentales fue el siguiente descrito en la Tabla No.1.

Sustancias Activas.

Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo A	50 µg
Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo C	50 µg
Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo W ₁₃₅	50 µg

Placebo.

Diluyente para vacuna polisacarídica (20 ampollas de 10 dosis), acompañados con el correspondiente certificado de análisis de calidad emitidos por AICA (Laboratorio Farmacéutico) de liberación de lote. El mismo fue almacenado a una temperatura de 2-8 °C hasta su uso.

<u>Ingredientes</u>	<u>Concentración</u>
Lactosa	2,5 – 5,0 mg
Cloruro de Sódio	4,159 50 µg
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro Na ₂ HPO ₄	0,053_50 µg
Fosfato de Sódio monobásico NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,0205 µg
Agua para inyección q.s.p	0,500 mL

Proveedor: Dirección de Producción. Instituto Finlay, Habana. Cuba.

Condiciones de almacenamiento: Ídem a la sustancia de ensayo.

Observaciones Clínicas.

Todas las observaciones se comenzaron a realizar a partir de la fecha de inicio experimental tiempo cero (T0) dos veces al día, considerado este como el momento en que se comenzaron a tomar los primeros datos específicos del estudio.

Síntomas Clínicos.

Se realizó la exploración clínica de los animales diariamente, prestando especial atención al punto de inoculación y a la aparición y/o manifestación de síntomas como: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación o depresión, incoordinación y diarreas.

Peso corporal.

Los animales fueron pesados al comienzo y fin del período de adaptación registrando los pesos en aras de seleccionar aquellos que participarían en el estudio. En el momento de la inoculación (fecha de inicio experimental) se pesaron los animales para saber peso real de los mismos al comienzo del estudio; para las hembras estuvo en el rango de 145 – 189 g y para los machos de 181 – 227 g. Así mismo, se realizaron pesajes a todos los animales a intervalos semanales registrándose de forma individual por grupo y tratamiento. Se realizaron pesajes a los 0, 7 y 14 días post-inoculación.

Consumo de agua.

El agua fue suministrada *ad libitum*, se realizó al comienzo del estudio (T0) y luego en días alternos se midió el remanente de agua con una probeta de 1000 mL; para ello, se depositaron 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja de ratas, el volumen remanente se registró y calculó por diferencia el volumen consumido por el grupo. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, esta diferencia se dividió entre el número de animales de la caja y el número de días transcurridos desde la última medición.

Consumo de alimentos.

Igualmente se realizó al inicio del estudio (T0) y luego en días alternos, cada vez que se hizo una medición se completaron en las tolvas de las cajas 500 g de pienso. Con la ayuda de una balanza técnica se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el consumo de agua.

Estudios anatomopatológicos.

Estos estudios comprendieron principalmente la evaluación macroscópica donde se examinaron todos los órganos, el sitio de administración de la vacuna y solo se tomaría muestras de aquellos en los que pudiera observarse lesiones; siendo el caso, las

muestras de tejidos serían fijadas durante las primeras 24 h con formaldehído al 10 % neutralizado con carbonato de calcio para proceder a través de las técnicas convencionales de histopatología.

Método de eutanasia y punto final.

El método de eutanasia de los animales se realizó por sobre dosis de anestésicos general Tiopental Sódico vía intraperitoneal en dosis de 100 mg/kg de peso y Alothane BP por sobre dosis de exposición por inhalación, recomendados por consejo canadiense para el cuidado de los animales de laboratorio, descrito en la guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (19), cumpliendo con las directrices sobre la eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (20), y aprobado por el comité de ética del Instituto Finlay. Este método se aplicó en momento del punto final de cada estudio y grupos de animales según diseños experimentales.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se creó una base de datos en Microsoft Excel y se procesaron los mismos utilizando el programa estadístico STATISTICA 6.0 (21). Para todos los casos se aplicó como criterio de significación estadística $p < 0.05$, excepto para la verificación de la aleatorización que se consideró significativo un valor de $p < 0,1$.

Para las variables continuas (peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento) se realizó un análisis de comparación múltiple, incluyendo la comprobación de la normalidad de los datos, así como el chequeo de la igualdad de varianza. Los grupos de datos que cumplieron lo antes señalado se procesaron por ANOVA y los que no lo cumplieron por la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados y discusión.

Signos clínicos y mortalidad.

Durante el ensayo no se observaron síntomas clínicos, ni se registraron muertes en ninguno de los animales en estudio.

Peso corporal.

Todos los animales incrementaron su peso corporal durante los 14 días posteriores a la inoculación (Gráficos No. 1 y 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control ($P < 0.05$) y los machos mostraron un aumento de peso más acelerado que las hembras ($P < 0.05$). Las curvas de incremento de peso de los animales correspondieron con las observadas en ensayos anteriores en nuestras instalaciones y los reportados por la literatura (22-26).

Consumo de agua.

El comportamiento de este parámetro fue de forma similar entre todos los grupos evaluados en este estudio (Gráficos No. 3 y 4), los machos consumieron más que las hembras ($P < 0.05$) siendo de 22,95 – 35,29 mL para los primeros y de 17,66 – 26,88 mL para las hembras. En general, estos resultados se correspondieron con los valores históricos observados para las ratas de esta categoría en nuestras instalaciones (22-24).

Consumo de alimentos.

El consumo de alimentos, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamientos ($P < 0.05$, Gráficos 5 y 6), los machos consumieron más que las hembras ($P < 0.05$), todo lo cual coincidió con las medias históricas de los animales de esta línea y categoría (22-24).

Estudio anatomopatológico.

Durante la necropsia realizada, no se observaron lesiones macroscópicas de valor en órganos, que fueran atribuibles a procesos tóxicos. No obstante describimos y discutimos a continuación la situación dada en un animal en particular desde el punto de vista macroscópico.

En el estudio anatomopatológico macroscópico realizado se estableció en el animal macho 23 un proceso de mala oclusión de la arcada dentaria, la cual estuvo relacionado con la disminución de peso corporal en el referido animal, estos procesos son de frecuente presentación en los animales de laboratorio, se conoce la importante y estrecha relación que hay entre la trayectoria incisiva (plano inclinado en el sector anterior), la trayectoria molar (engranamiento antero posterior entre las cúspides

antagónicas) y la trayectoria sagital condílea (plano inclinado que representa la pared anterior de la fosa glenoidea) (27).

En un principio la articulación temporomandibular manifiesta una estructura anatómica determinada exclusivamente por la información genética que trae el individuo. Luego, la función que le es inherente hace que vaya cambiando según las necesidades que le exige el medio ambiente.

Investigaciones recientes referidas a la adaptabilidad de la articulación temporomandibular han demostrado la necesidad de adaptar la oclusión a la articulación temporomandibular, puesto que una maloclusión y consecuente mal función de la misma pueden repercutir en la estructura y morfología de la articulación (28). Rabie y colaboradores trabajaron sobre la alteración en el crecimiento y desarrollo de la articulación temporomandibular de ratas en crecimiento a las que le produjeron un adelantamiento mandibular permanente. Nakano y colaboradores estudiaron los cambios mandibulares y de la articulación temporomandibular a partir de una lateralización permanente de la mandíbula en ratas en crecimiento (29). En el resto de los animales estudiados de este estudio no se observaron lesiones.

Conclusiones

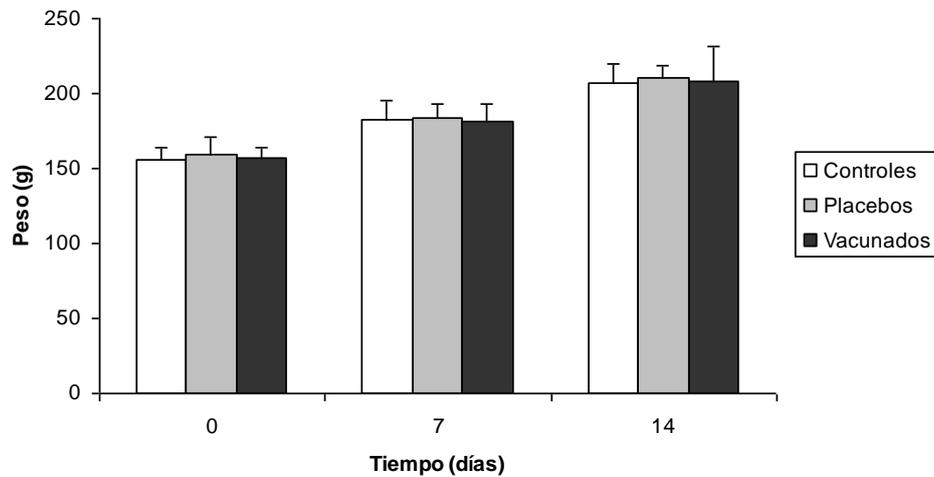
- No se observaron muertes durante el ensayo, ni se registraron síntomas que indicaran toxicidad local ni sistémica.
- El peso vivo de los animales, así como el consumo de agua y alimentos no mostraron diferencias entre grupos de tratamientos que indicaran toxicidad del producto evaluado.
- No se observaron alteraciones anatomopatológicas de valor toxicológico.
- Bajo las condiciones del estudio, el candidato vacunal evaluado no evidenció efectos adversos toxicológicos en el modelo animal usado siendo bien tolerado por estos al ser aplicada la misma por vía intramuscular, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

Agradecimientos: Quisiéramos agradecer a los obreros de la instalación de animales por toda la ayuda y soporte brindado durante el ensayo, Alex Quintero Pérez, Pedro Daniel Alfonso Anazco, Agustín Borrero Delgado y a la Lic. Longeia Campos de la vicepresidencia de Calidad del Instituto Finlay por su colaboración.

Tabla No.1 Diseño experimental estudio de dosis única

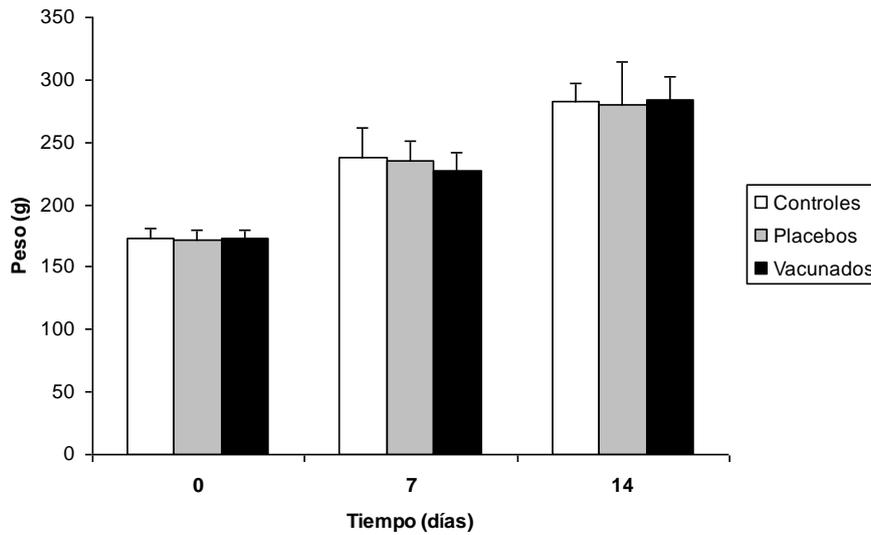
Grupo	Sexo	N	N de eutanasia (14 días)
Control	Hembras	10	10
	Machos	10	10
Placebo	Hembras	10	10
	Machos	10	10
Vacuna	Hembras	10	10
	Machos	10	10

Gráfico No.1: Comportamiento del peso corporal de ratas SD Hembras. Estudio de Dosis Unica Vacuna ACW135



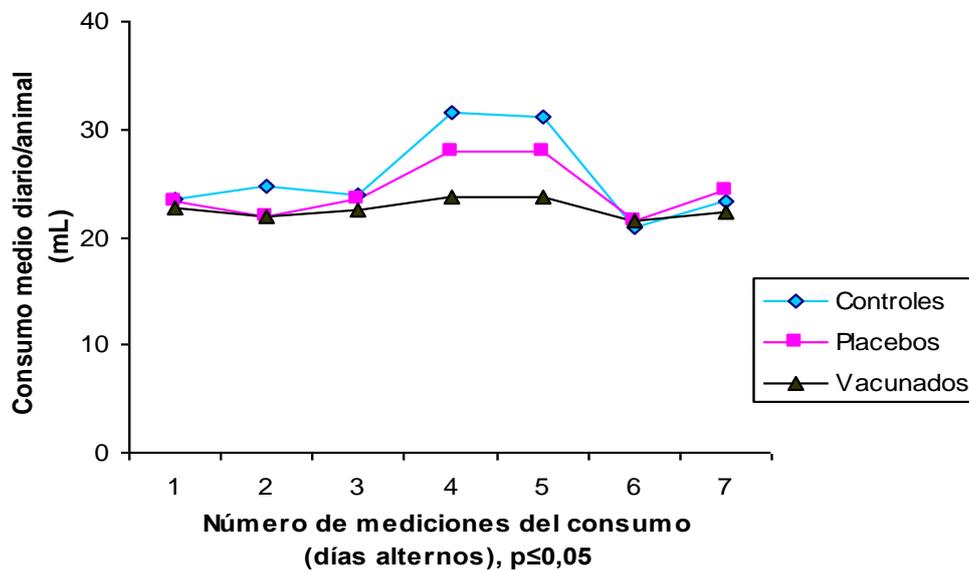
X, media \pm D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, ANOVA.

Gráfico No.2: Comportamiento del peso corporal de ratas SD Machos. Estudio de Dosis Unica Vacuna ACW135



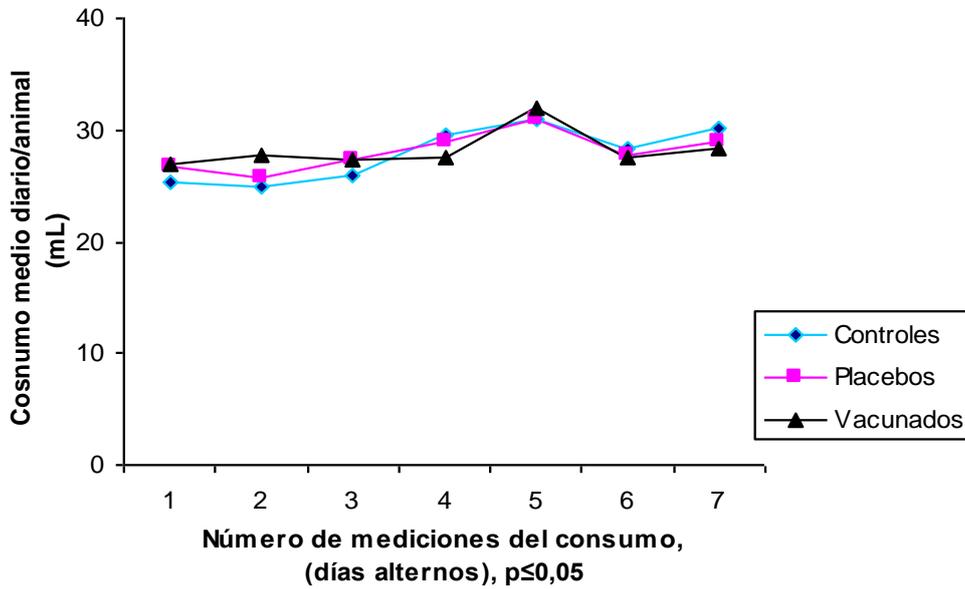
X, media \pm D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, ANOVA.

Gráfico No.3: Comportamiento del Consumo de agua de ratas SD Hembras. Estudio de Dosis Unica Vacuna ACW135



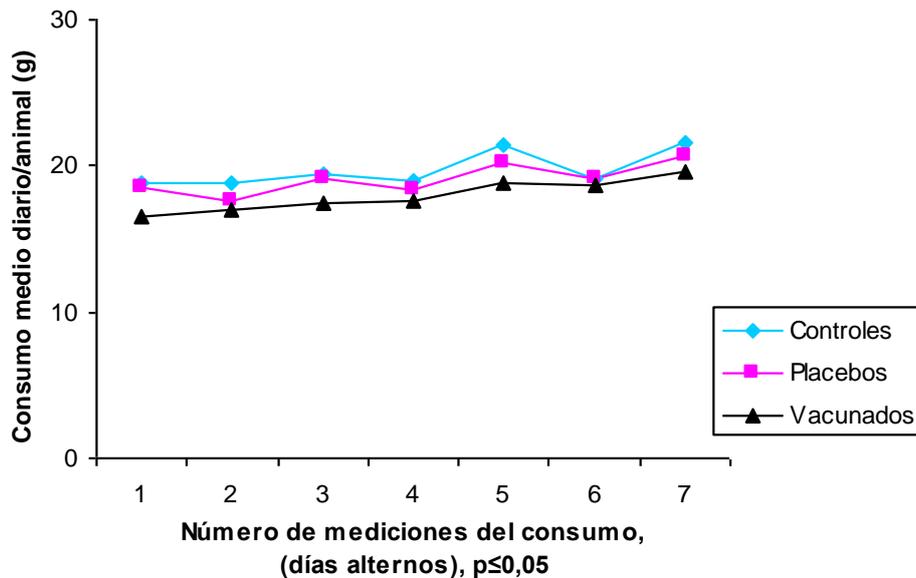
X, media \pm D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, ANOVA.

Gráfico No.4: Comportamiento del Consumo de agua de ratas SD Machos. Estudio de Dosis Unica Vacuna ACW135

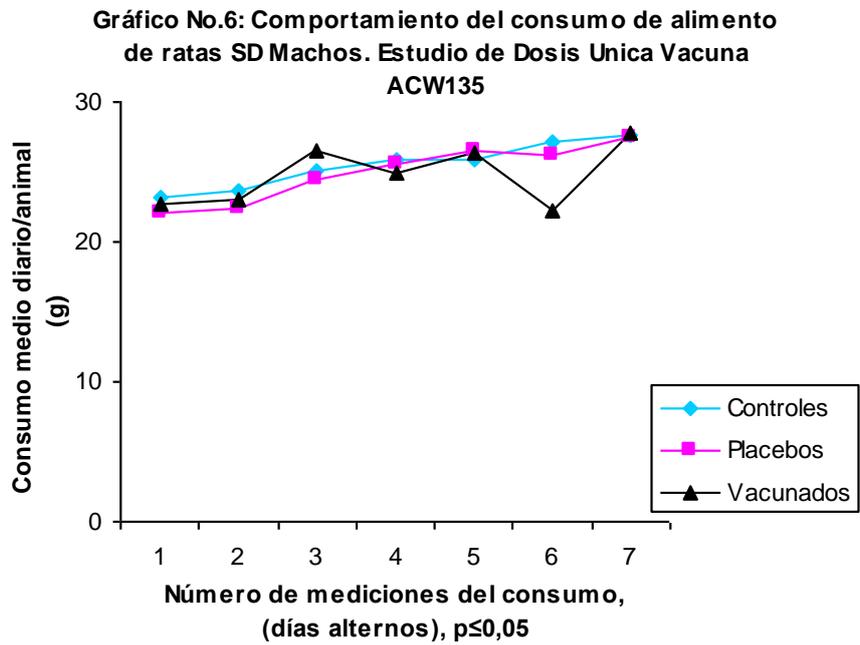


X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, ANOVA.

Gráfico No.5: Comportamiento del consumo de alimento de ratas SD Hembras. Estudio de Dosis Unica Vacuna ACW135



X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, Kruskal-Wallis.



X, media \pm D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p < 0.05$, Kruskal-Wallis.

Referencias Bibliográficas

- 1-** Ochoa RF; Sierra G; Martínez I, Cuevas I. Prevención de la Enfermedad Meningocócica. Finlay Ediciones, 2010, ISBN: 978-959-7076-22-3.
<http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
- 2-** WHO. World Health Organization Epidemiological Centre, Fact sheet N°141, Revised May 2003.
- 3-** WHO. World Health Organization. Control of epidemic meningococcal disease. WHO Practical guidelines. 2ª Ed. Disponible en: <http://www.who.int/emc>. Consultado: Enero 2011.
- 4-** Almeida A. Enfermedad por meningococo, Neisseria meningitidis: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. Salud pública Méx. [serial on the Internet]. 2004 Oct. 46(5): 438-450. Disponible en:
http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000500010 Consultado: Febrero 2011.
- 5-** WHO. World Health Organization May 2005. Proceedings Immunization of the fifth Global Vaccine research Forum. Montreux, Switzerland 7-10 June 2004. Immunization, Vaccines and Biologicals.
http://www.who.int/vaccine_research/documents/GVRF04_Report.pdf . Consultado: Febrero 2011.
- 6-** Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de la Calidad en Ensayos Toxicológicos. Resolución No. 152/92. Editorial Ciencias Médicas. MINSAP 1993.
- 7-** Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Vol 1 and 2. Prot. 407. Paris 1993.
- 8-** Normas sobre Medicamentos de la Comunidad Europea, Vol. III. "Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano". Directrices Fármaco-Toxicológicas. Página 91 (No. 2, secc. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE). Versión español. Enero 1989 y 1998.

- 9-** Regulación 75/318 CEE. Normas y Protocolos Analíticos, Tóxico-Farmacológicos y Clínicos en materia de pruebas de Medicamentos. 1997.
- 10-** Agencia Europea para la Evaluación de Productos de Medicina (EMA). Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines, 1997.
- 11-** Infante JF, Pérez MO, Sifontes RS, Díaz RD, del Campo J, Roble SE. Ensayo de Tolerancia Local de los cocleatos en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/01/04, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.
- 12-** Sosa E, Sifontes S, Infante JF, Díaz D, López Y, Pérez V, Hernández T, Riverón L, Valdés Y, García I, Fariñas M, Parajón E, Rodríguez N. Estudio de tolerancia local de la vacuna vax-TyVi® en ratas Sprague Dawley. Vaccinmonitor 2005; 14(1):21-27
- 13-** Food and Drugs Administration FDA. Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research February 2006.
- 14-** Verdier F. Non-Clinical Safety Assessment of Preventive Vaccines. The Industry Perspective. Proceedings of the Workshop on: Non-Clinical Safety Evaluation of Preventive Vaccines: Recent Advances and Regulatory Considerations. Vol I. Arlington, Virginia. 2002; 39-72.
- 15-** Sifontes S. Estudio de Toxicidad por dosis Única de la Vacuna Antimeningocócica VA-MENGOC-BC® en ratas Sprague Dawley. Informe Técnico. Instituto Finlay. 2004.
- 16-** Estudio de inocuidad e inmunogenicidad protectogénica de la vacuna antimeningocócica VA- MENGOC- BC en modelos murinos. Tesis de grado científico Juan Francisco Infante Bourzac. Vicepresidencia de Investigaciones Instituto Finlay, Centro autorizado Universidad Agraria de la Habana, año 2000; 1-123.
- 17-** Voisin. Extrapolation of Animal Toxicity to Humans: interspecies comparisons in drug development. Regulatory Toxicology and Pharmacology 1990; 12(2):107-116.

- 18-** Karl D, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumen. J. Appl. Toxicol 2001; 21:15-23.
- 19-** Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition, http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12910. PAPERBACK ISBN-10: 0-309-15400-6 ISBN-13: 978-0-309-15400-0. 2010; 27-57.
- 20-** AVMA. American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia, (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia) June, 2007. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.
- 21-** Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. 2003.
- 22-** Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E, Fariñas M, Núñez F, Hernández T, Torres V. Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL® en ratas Sprague Dawley. VaccMonitor 2004; 13(2):11-16.
- 23-** Ensayo de Toxicidad por Dosis única de la Vacuna DT-Poli Vi en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/6/2003, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.
- 24-** Ensayo de Tolerancia Local de la Vacuna Antitifoídica vax-TyVi® en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/3/2003, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.
- 25-** Johns Hopkins University. (JHM) Animal care and use committee. Address. 620 McElderry Street Reed Hall, Room B122 Baltimore, MD 21205-191. 2010; 78-97. <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>. 2010.
- 26-** Núñez JF, Herrera I, Infante JF, González P, Pérez V, Argamasilla M. Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. Vaccimonitor 2006; 15(2):9-14.
- 27-** Figún M, Garino R. Anatomía Odontológica Funcional y Aplicada 2º ed. Buenos Aires. 2001; 125-186.

-
- 28-** Rabie AB, Zhao Z, Shen G, Hagg EU, Dr O, Robinson W. Osteogenesis in the glenoid fossa in response to mandibular advancement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2001; 119(4):390-400.
- 29-** Nakano H, Maki K, Shibasaki Y, Miller AJ. Three-dimensional changes in the condyle during development of an asymmetrical mandible in a rat: a microcomputed tomography study. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004; 126(4):410-420.

Recibido: 15/06/11

Aceptado: 17/06/11