

Guía para la Industria

Estudios para Evaluar la Seguridad de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Humanos: Estudios de Toxicidad Genética

VICH GL23

GUIA FINAL

(Esta versión de la guía reemplaza la de Enero 3, 2002. Este documento guía se revisó para corregir la información de contacto en relación a este documento.)

Este documento guía recomienda una batería básica de estudios que pueden ser usados para evaluar la toxicidad genética de medicamentos veterinarios presentados para su aprobación a la Unión Europea, Japón, y los Estados Unidos.

Comentarios y sugerencias relacionadas al documento deben enviarse a: Dockets Management Branch (HFA-305), Food and Drug Administration (FDA), 5630 Fishers Lane, Rm. 1061, Rockville, MD 20852, USA. Comentarios electrónicos pueden enviarse a:

<http://www.fda.gov/dockets/ecomments>. Todos los comentarios deben ser identificados con el número del documento y referirse a "Docket No. 00D-1631".

Para preguntas relacionadas a este documento, contactar a: Division of Human Food Safety, Center for Veterinary Medicine, (HFV-150), FDA, 7500 Standish Place, Rockville, MD 20855, 301-594-1626.

ESTUDIOS PARA EVALUAR LA SEGURIDAD DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN ALIMENTOS HUMANOS: ESTUDIOS DE TOXICIDAD GENÉTICA

Recomendada para Implementación
por el Comité Directivo de VICH
en Etapa 7 del Proceso de VICH,
en Junio de 2001

ESTA GUIA FUE DESARROLLADA POR UN GRUPO DE EXPERTOS DE VICH Y ENVIADA EN CONSULTA A LAS DIFERENTES REGIONES, DE ACUERDO AL PROCESO DE VICH. EN LA ETAPA 7 DEL PROCESO, SE RECOMIENDA LA ADOPCIÓN DEL BORRADOR FINAL POR LOS ORGANISMOS REGULADORES DE LA UNIÓN EUROPEA, JAPÓN Y LOS ESTADOS UNIDOS.

ESTUDIOS PARA EVALUAR LA SEGURIDAD DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN ALIMENTOS HUMANOS: ESTUDIOS DE TOXICIDAD GENETICA

1. INTRODUCCION.....	4
1.1. <i>Objetivo de la guía</i>	4
1.2. <i>Antecedentes generales.....</i>	4
1.3. <i>Alcance de la guía.....</i>	4
2. BATERIA ESTANDAR DE ESTUDIOS.....	5
3. MODIFICACIONES A LA BATERIA ESTANDAR.....	6
3.1. <i>Antimicrobianos.....</i>	6
3.2. <i>Activación metabólica.....</i>	6
4. REALIZACION DE LOS ESTUDIOS.....	6
4.1. <i>Estudios bacterianos.....</i>	6
4.2. <i>Estudio In Vitro para detectar efectos cromosomales en células de mamíferos.....</i>	6
4.3. <i>Estudio In Vitro para detectar mutación genética en células de mamíferos.....</i>	7
4.4. <i>Estudio In Vivo para detectar efectos cromosomales.....</i>	7
EVALUACION DE LOS RESULTADOS.....	7
REFERENCIAS.....	8
GLOSARIO	9

Esta guía final representa el pensamiento actual de la agencia en esta área y no crea o confiere ningún derecho para o sobre alguna persona y no obliga al FDA o al público. Puede usarse un método alternativo siempre que satisfaga los requisitos de los estatutos y/o regulaciones aplicables.

1. INTRODUCCION

1.1. Objetivo de la guía

Se recomiendan varias evaluaciones toxicológicas para establecer la inocuidad de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos humanos, incluyendo la evaluación de posible riesgo de toxicidad genética. Muchos carcinogénicos tienen un modo de acción genotóxico y es prudente considerar las genotoxinas como carcinogénicos potenciales a menos que exista evidencia convincente que ese no es el caso. Además, sustancias que causan toxicidad reproductiva y/o en el desarrollo pueden tener un modo de acción que involucra mecanismos genotóxicos. Los resultados de los estudios de genotoxicidad normalmente no afectarán el valor numérico de la Ingesta Diaria Aceptable (IDA), pero pueden influir en la decisión de establecer una IDA.

El objetivo de esta guía es asegurar armonización internacional de los estudios de genotoxicidad.

1.2. Antecedentes generales

Existían divergencias en los requisitos de estudios de genotoxicidad entre la Unión Europea (UE), Japón y los Estados Unidos, para establecer la inocuidad de medicamentos veterinarios en alimentos humanos.

Esta guía forma parte de una serie de guías de VICH desarrolladas para facilitar la aceptación mutua por las autoridades reguladoras pertinentes, de datos de inocuidad necesarios para establecer el IDA de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos humanos. Debería leerse en conjunto con la guía de estrategia general para la evaluación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos humanos (Guía de VICH sobre Enfoque General de los Estudios que estará pronto a disposición). La guía de VICH se desarrolló considerando las guías existentes de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos para Uso Humano: "Genotoxicidad: Batería Estándar de Estudios de Genotoxicidad para Medicamentos" y "Guía de Aspectos Específicos Relacionados a Estudios de Genotoxicidad de Medicamentos" (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: "Genotoxicity: A Standard Battery of Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals" and "Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals"). También se consideraron las guías de OECD (Organization for Economic Operation and Development) para estudios de sustancias químicas, guías nacionales/regionales, y prácticas actuales para evaluar la inocuidad de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos humanos en la UE, Japón, Australia y Nueva Zelanda.

1.3. Alcance de la guía

Este documento guía recomienda una Batería Estándar de Estudios que pueden ser usados para evaluar la genotoxicidad de medicamentos veterinarios. En la mayoría de los casos los resultados darán una indicación clara si el material en estudio es o no genotóxico. Sin embargo, la Batería Estándar de Estudios no es apropiada para ciertas clases de medicamentos veterinarios. Por ejemplo, algunos antimicrobianos pueden ser tóxicos para las cepas a usar en el estudio de mutación genética bacteriana. La guía recomienda modificaciones de la Batería Estándar de Estudios para estos medicamentos. A veces los resultados de la Batería Estándar o Corregida de

Estudios pueden ser poco claros o equívocos, por lo tanto se recomienda evaluación e interpretación de los resultados. En algunos casos pueden recomendarse estudios adicionales, por ejemplo, en el caso de sustancias que muestran potencial aneugénico y/o efectos en células germinales.

En la mayoría de los casos se estudia la sustancia original; sin embargo, en algunos casos puede ser necesario también estudiar uno o más de los metabolitos más abundantes presentes como residuos en el alimento. Casos en que se recomienda estudiar un metabolito incluyen situaciones en las cuales el metabolito tiene estructuras que llaman la atención y que no están presentes en la estructura molecular de la sustancia original; y cuando los residuos en alimentos son en su mayoría un metabolito que tiene una estructura molecular fundamentalmente diferente a la de la droga original. Se asume que sales, ésteres, residuos conjugados y ligados tienen propiedades genotóxicas similares a las del medicamento original, a no ser que se demuestre lo contrario.

2. BATERIA ESTANDAR DE ESTUDIOS

La siguiente batería de tres estudios se recomienda para obtener resultados preliminares de toxicidad de medicamentos veterinarios.

I. Estudio de mutación genética en bacterias

Existe una extensa base de datos para estudios de mutación reversa en bacterias referente a mutación genética en cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. Las cepas mejor validadas son las de *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537 (o TA 97 o TA 97a), TA 98, y TA 100. Estas cepas pueden no detectar algunos mutagénicos oxidantes y agentes con actividad cruzada; por lo tanto, para corregir esto, también se deberían usar en la batería de estudios, cepas de *Escherichia coli* WP2 (pKM101), WP2uvrA (pKM10) o *Salmonella typhimurium* TA 102. Es importante considerar que el estudio de mutación genética bacteriana, aunque es eficiente para realizar una evaluación preliminar de compuestos con potencial para inducir mutaciones genéticas, no detecta todos los compuestos con potencial mutagénico. Algunos compuestos clastogénicos no producen mutaciones en los estudios de *Salmonella* (ej., compuestos arsenicales inorgánicos).

II. Estudio *in vitro* para detectar efectos cromosomales en células de mamíferos

El segundo estudio debería evaluar el potencial de una sustancia química de producir efectos cromosomales. En la UE se prefiere el estudio citogenético *in vitro* usando análisis de metafase, el cual detecta clastogenicidad y aneugenicidad. En los Estados Unidos se prefiere el estudio de linfoma en ratón el cual, con modificaciones, puede detectar mutación genética y daño cromosomal. En Japón, cualquiera de estos estudios es aceptable.

III. Estudio *in vivo* para detectar efectos cromosomales en células hematopoyéticas de roedores

Un tercer estudio ha sido agregado a la Batería Estándar de Estudios para tener mayor certeza que la Batería Estándar detectará todos los mutagénicos potenciales. VICH estaba conciente que, para estudiar algunas clases de sustancias químicas, algunas autoridades recomendaban el uso de una batería inicial de estudios de mutagenicidad que consiste solamente en estudios *in vitro*, y recomendaban estudios *in vivo* solamente si la batería de estudios *in vitro* daba un resultado positivo o equívoco. VICH consideró este enfoque pero decidió incluir un estudio *in vivo* en la batería básica de estudios con el fin de armonizar con los requisitos de ICH para estudios de genotoxicidad de medicamentos para humanos. El estudio *in vivo* puede ser ya sea un estudio de micronúcleo o un estudio citogenético.

3. MODIFICACIONES A LA BATERIA ESTANDAR

La Bateria Estándar de Estudios debería ser suficiente para la mayoría de las sustancias. Sin embargo, en algunos casos puede ser apropiado modificar los protocolos de determinados estudios. Las propiedades físico-químicas de una sustancia (ej., volatilidad, pH, solubilidad, estabilidad, etc.) pueden a veces ser inapropiadas para las pruebas. Se recomienda considerar este factor antes de realizar los estudios. Deberían aplicarse protocolos modificados cuando es evidente que las condiciones estándares entregarán resultados falsos negativos. Las guías de OECD de Estudios de Sustancias Químicas para estudios de genotoxicidad dan algunos consejos sobre la susceptibilidad de algunas pruebas a las características físicas del material en estudio y sugieren algunas medidas compensatorias que pueden aplicarse. Los medicamentos a estudiar con baterías de estudios de genotoxicidad alternativas deberían considerarse en forma individual (caso por caso). Debería justificarse científicamente la razón de no usar la Bateria Estándar de Estudios.

3.1. Antimicrobianos

Algunas sustancias antimicrobianas son excesivamente tóxicas para las bacterias y por lo tanto difíciles de estudiar en estudios bacterianos. En este caso, sería apropiado realizar un estudio bacteriano usando concentraciones que alcanzan el límite de citotoxicidad y suplementar el estudio bacteriano con un estudio *in vitro* para mutaciones genéticas en células de mamíferos.

3.2. Activación metabólica

El estudio *in vitro* debería realizarse en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica. El sistema de activación metabólica más comúnmente usado es la mezcla S9 de hígados de ratas tratadas con un agente inductor de enzimas (Aroclor 1254 o una combinación de fenobarbital y beta-naftoflavona). Sin embargo, pueden usarse otros sistemas. Debería justificarse científicamente la elección de un sistema de activación metabólica alternativo.

4. REALIZACION DE LOS ESTUDIOS

4.1. Estudios bacterianos

Un estudio de mutagenicidad bacteriana reversa debería realizarse de acuerdo al protocolo descrito en la guía de OECD #471.

4.2. Estudio *in vitro* para detectar efectos cromosomales en células de mamíferos

Estudios de aberración cromosómica deberían realizarse de acuerdo a la guía de OECD #473. Estos estudios citogenéticos deberían detectar clastogenicidad y también podrían detectar heteroploidía. Tratamientos sostenidos más prolongados (ej: 3 ciclos celulares normales) pueden otorgar mayor sensibilidad para detectar poliploidía. Información limitada con respecto al potencial aneugénico puede obtenerse anotando las incidencias de hiperploidía, poliploidía y/o modificación del índice mitótico obtenidos en la prueba citogenética. Si hay indicadores de aneugenicidad (ej: inducción de poliploidía), esto debería ser confirmado usando procedimientos de tinción apropiados tales como fluorescencia de hibridización *in situ* (FISH) o pintado de cromosomas. Debido a que artificialmente puede ocurrir una pérdida aparente de cromosomas, solamente hiperploidía debería considerarse como indicación clara de aneuploidía inducida.

Si se realiza el estudio de timidina kinasa (tk) en células de ratón, debería realizarse con un protocolo modificado que incluya mediciones de colonias pequeñas y grandes. El protocolo debería reflejar el criterio especificado en la guía de OECD #476 y debería incluir el uso de controles positivos apropiados (clastógenos).

4.3. Estudio *in vitro* para detectar mutación genética en células de mamíferos

Cuando se usa un estudio *in vitro* de mutación genética en células de mamíferos, debería realizarse de acuerdo a la guía de OECD #476.

4.4. Estudio *in vivo* para detectar efectos cromosomales

Como parte de la batería inicial de estudios de genotoxicidad, puede realizarse un estudio de micronúcleo en eritrocitos de mamíferos (guía de OECD #474) o un estudio de aberración cromosómica en médula ósea (guía de OECD #475). El estudio de micronúcleo en eritrocitos de mamíferos puede realizarse analizando ya sea usando médula ósea o sangre periférica. Si se realiza usando sangre periférica, la especie a utilizar debería ser el ratón y no la rata, debido a que el bazo de la rata remueve los eritrocitos micronucleados circulantes.

Estos estudios están diseñados para determinar cualitativamente si una sustancia es o no genotóxica *in vivo*, pero no para establecer niveles de no-efecto.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

La evaluación del potencial genotóxico de un compuesto debería considerar la totalidad de los hallazgos y conocimiento de los valores intrínsecos y limitaciones de los estudios *in vitro* e *in vivo*. Resultados negativos claros de genotoxicidad en una serie de estudios, incluyendo la Batería Estándar de Estudios, deberían tomarse generalmente como evidencia suficiente de ausencia de genotoxicidad.

Si una sustancia entrega resultados positivos claros de genotoxicidad *in vitro*, pero resultados negativos claros en estudios de genotoxicidad *in vivo* realizados en médula ósea, debería realizarse otro estudio de genotoxicidad *in vivo* usando un tejido blanco diferente a médula ósea para confirmar la genotoxicidad de la sustancia. El estudio más apropiado debería ser decidido caso por caso.

En el caso de otro resultado positivo o equívoco en la Batería Estándar de Estudios, la necesidad de realizar estudios adicionales debería ser considerada caso por caso.

REFERENCIAS

OECD. 1997. Test Guideline 471. Bacterial Reverse Mutation Test. En: Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, Organisation for Economic Cooperation & Development.

OECD. 1997. Test Guideline 473. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. En: Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, Organisation for Economic Cooperation & Development.

OECD. 1997. Test Guideline 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. En: Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, Organisation for Economic Cooperation & Development.

OECD. 1997. Test Guideline 475. Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. En: Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, Organisation for Economic Cooperation & Development.

OECD. 1997. Test Guideline 476. *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test. En: Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris, Organisation for Economic Cooperation & Development.

GLOSARIO

Aneugenicidad: Habilidad de causar aneuploidía.

- Aneuploidía:** Desviación numérica del número modal de cromosomas en una célula u organismo, más allá de un número extra o reducido de una serie completa de cromosomas (números de cromosomas no son múltiplos del básico).
- Clastógeno:** Un agente que produce cambios estructurales de los cromosomas, usualmente detectables al microscopio óptico.
- Clastogenicidad:** La habilidad de causar cambios estructurales de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).
- Citogenética:** Análisis cromosomal de las células, normalmente realizado en células en estado de división cuando los cromosomas están condensados y visibles al microscopio óptico después de la tinción.
- Mutación genética:** Cambio detectable permanente en un gen o sus secuencias reguladoras. El cambio puede ser una mutación puntual, inserción, delección, etc.
- Genotoxicidad:** Término amplio que se refiere a cualquier cambio deletéreo en el material genético sin importar el mecanismo que induce el cambio.
- Heteroploidía:** Cualquier número anormal de cromosomas en una célula u organismo. Es un término general que incluye poliploidía, aneuploidía, hiperploidía, etc.
- Hiperploidía:** Aumento del número de cromosomas por sobre el número normal en una célula u organismo.
- Micronúcleo:** Partícula en una célula que contiene DNA nuclear microscópicamente detectable; puede contener un cromosoma completo o un trozo céntrico o parte(s) acéntricas del cromosoma o cromosomas. El tamaño de un micronúcleo generalmente se define como menos de 1/5 pero más de 1/20 del tamaño del núcleo principal.
- Mutagenicidad:** Capacidad de causar un cambio permanente en la cantidad o estructura del material genético en un organismo o célula que puede resultar en cambios en las características del organismo o célula. La alteración puede involucrar cambios en la secuencia de las bases del ácido nucleico (mutación genética), cambios estructurales en los cromosomas (clastogenicidad) y/o cambios en el número de cromosomas en las células (aneuploidía o poliploidía).
- Poliploidía:** Número extra o reducido de series completas de cromosomas.