

Toxicidad aguda extendida por vía intranasal de SURFACEN® en ratas

Expanded acute toxicity by intranasal administration of SURFACEN® in rats



CU-ID: 2248/v44e06

¹Elaine Díaz Casañas^{1*}, ²Lianet Díaz Pérez¹, ³Wilma Alfonso Lorenzo¹, ⁴Odalys Blanco Hidalgo²

¹Departamento de Producción, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

²Departamento de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los estudios de irritabilidad local para los productos inhalados constituyen un eslabón fundamental en la cadena de requisitos regulatorios de los estudios preclínicos toxicológicos, por este motivo el objetivo del trabajo fue determinar el potencial irritante de SURFACEN® en dosis repetidas por vía intranasal. Se utilizaron 30 ratas C57BL/6J (15 de cada sexo) distribuidas en dos grupos experimentales: control (solución de NaCl 0,9 %) y tratado (SURFACEN®). Ambos grupos recibieron el mismo esquema de tratamiento con dos aplicaciones diarias espaciadas entre sí, de cuatro a seis horas por vía intranasal, durante 14 días. La dosis a aplicar fue de 13,27 mg/kg. Las variables a evaluar fueron la observación clínica, el peso corporal, el peso corporal *post mortem*, el peso absoluto y relativo de los órganos seleccionados (pulmones, encéfalo) de cada animal y los estudios anatomopatológicos. El diseño y la conducción de la investigación se realizó según los principios de bienestar animal. Todos los animales sobrevivieron al estudio. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en las variables estudiadas. No hubo signos de toxicidad manifiestos tras la administración de SURFACEN® y no se detectaron alteraciones anatomopatológicas que pudieran estar asociadas a la administración del medicamento. Se evidenció que la aplicación de dosis repetidas por vía intranasal de SURFACEN® no alteró la morfología celular de la mucosa nasal, no causó daños histopatológicos en los órganos estudiados y no produjo signos de irritación local, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

Palabras clave: SURFACEN®, toxicidad, irritación local, ratas Sprague Dawley.

ABSTRACT: Local irritability studies for inhaled products constitute a fundamental link in the chain of regulatory requirements for preclinical toxicological studies. For this reason, the objective of the work was to determine the irritation potential of SURFACEN® in repeated doses by intranasal route. Thirty C57BL/6J rats (15/sex) were divided into two experimental groups: control (0.9 % NaCl solution) and treated (SURFACEN®). Both groups received the same treatment scheme with two daily intranasal applications spaced four to six hours apart, for 14 days. The dose to be applied was 13.27 mg/kg. Clinical observations, body weight, *post mortem* body weight, absolute and relative weight of the selected organs (lungs, brain) of each animal and pathological study were the variables to be studied. The design and implementation of the research was carried out according to the animal welfare principles. All animals survived the study. No statistically significant differences were evidenced between both groups regarding the variables studied. There were no signs of overt toxicity after SURFACEN® administration, and no anatomopathological alterations that could be associated with the administration of the drug were detected. It was evidenced that the application of repeated doses of SURFACEN® by intranasal route did not alter the cell morphology of the nasal mucosa, did not cause histopathological damage in the organs studied and did not produce signs of local irritation, thus it is considered potentially non-toxic for humans.

Key words: SURFACEN®, toxicity, local irritation, Sprague Dawley rats.

INTRODUCCIÓN

La vía inhalatoria es de elección para la administración de medicamentos, como los broncodilatadores y antiinflamatorios en el tratamiento de enfermedades obstructivas de las vías aéreas (asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, principalmente). Las altas concentraciones de fármacos en los pulmones y las bajas concentraciones sistémicas conferidas por inhalación, conducen a una alta eficacia, al tiempo que reducen el riesgo de efectos secundarios, lo que constituye su principal ventaja (1, 2).

El surfactante pulmonar suministrado en forma de aerosol es una alternativa atractiva, ya que elimina los riesgos derivados de la instilación de grandes volúmenes de líquido administrados directamente a los pulmones. Estudios clínicos indican la viabilidad y seguridad de esta vía de administración, pero el éxito depende de la eficacia del surfactante empleado, la técnica de generación de aerosoles, el depósito del medicamento en las vías respiratorias y las estrategias de dosificación (3).

*Correspondencia a: Elaine Díaz Casañas. E-mail: elaine@censa.edu.cu

Lianet Díaz Pérez. E-mail: lianet@censa.edu.cu

Recibido: 19/05/2022

Aceptado: 27/06/2022

SURFACEN® es un surfactante pulmonar de origen porcino, diseñado, producido y comercializado por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Está registrado en Cuba para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria en niños y adultos; la vía de administración es por instilación endotraqueal (4,5). Recientemente se realizó un estudio preclínico en un modelo de asma alérgica, donde se demostró que SURFACEN®, administrado en forma de aerosol, indujo un efecto farmacológico favorable como broncodilatador comparable al Salbutamol, en consonancia con su acción como surfactante pulmonar, con un efecto inmunomodulador, antiinflamatorio y antialérgico (6).

Los estudios de tolerancia o irritabilidad local para los productos inhalados constituyen un eslabón fundamental en la cadena de requisitos regulatorios de los estudios preclínicos toxicológicos (7), sobre todo si se tiene en cuenta que la utilización de esta vía es una tendencia actual por las ventajas que ofrece; por este motivo el objetivo del trabajo fue determinar el potencial irritante de SURFACEN® en dosis repetidas por vía intranasal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo según las guías publicadas por la Agencia Europea de Medicina (EMEA, por sus siglas en inglés) (7), las Buenas Prácticas de Laboratorio y los procedimientos establecidos en el Centro de Toxicología Experimental (CETEX) del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Mayabeque, Cuba.

• *Animales de experimentación*

Se utilizaron 30 ratas jóvenes saludables con una edad de seis a siete semanas de la sublínea C57BL/6J procedentes de la División de Animales Gnotobióticos del CENPALAB, con su correspondiente Certificado de Salud. En el caso de las hembras, núlparas y no grávidas, se mantuvieron en readaptación por un periodo de cinco días antes de comenzar el ensayo; alcanzaron un peso promedio de 167,39 g \pm 5,96 las hembras y 182,35 g \pm 4,99 los machos.

• *Condiciones de alojamiento y alimentación*

Los animales fueron alojados en cajas plásticas tipo T3 de policarbonato, con fondos y tapas de rejilla de metal inoxidable y cambiable (Tecniplast, Italia), además de bandejas plásticas para la recolección de los desechos. Se colocaron a razón de tres y dos por caja, en condiciones ambientales controladas (22,97°C \pm 0,110; humedad relativa 69,95 % \pm 0,093; ciclo de luz/oscuridad de 12 h). Se les suministró agua potable y alimento para roedores ALYco® producido en

el CENPALAB (fórmula EAO 1004 peletizada) *ad libitum*. Tanto el agua como el alimento se esterilizaron en autoclave.

• *Sustancia de ensayo*

SURFACEN® liofilizado (lote SU051020); cada bulbo contiene 50 mg de fosfolípidos, que se reconstituyeron con tres mililitros de agua para inyección.

• *Grupos de tratamiento e intervención*

Al concluir el periodo de readaptación, los animales se distribuyeron al azar para formar dos grupos experimentales: control (cinco de cada sexo) y tratado (10 de cada sexo). La distribución aleatoria se realizó a través del programa de números aleatorios LABTOOLS. Al grupo tratado se le administró SURFACEN®, mientras que al grupo control se le administró solución de cloruro de sodio 0,9 %; ambos por vía intranasal.

El aerosol puede producir una distribución de surfactante más homogénea en el pulmón, por lo que es posible que se necesite menos medicamento, de 2 mg/kg a 3 mg/kg frente a la dosis instilada habitual de 100 mg/kg (8). De ahí que la propuesta de dosis a administrar, en estudios clínicos futuros en niños, sea precisamente 3 mg/kg. Teniendo en cuenta el peso y las relaciones alométricas entre el hombre y el modelo experimental utilizado, la dosis a aplicar en ratas es de 13,27 mg/kg (9). Se administró el máximo volumen permisible (100 μ L) teniendo en cuenta la especie, peso y vía de administración (50 μ L por fosa nasal) (10). Ambos grupos siguieron el mismo esquema de tratamiento con dos aplicaciones diarias espaciadas entre sí de cuatro a seis horas, durante cinco días.

• *Observación clínica*

La exploración clínica de los animales se realizó posterior a cada administración del producto en ensayo. En todos los casos se evaluó individualmente el estado general de los animales hasta completar los 14 días después de la primera administración con especial atención a las fosas nasales, a la aparición y/o manifestación de piloerección, postración, salivación, lagrimeo, cambios en piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrón de comportamiento. Se prestó particular vigilancia a la posible aparición de diarrea, temblores, convulsiones, letargia, sueño y coma (11).

• *Peso corporal (PC)*

Los animales se pesaron aproximadamente a las 72 horas de ser recibidos; se verificó que los extremos del peso corporal no excedían más de 20 % del valor promedio. El peso corporal se determinó a todos

los animales en una balanza electrónica (KERN PFB 1200 g, Alemania) de forma individual por grupo y tratamiento, antes de la administración de la sustancia y a intervalos semanales (11).

- *Método de Eutanasia y principios éticos*

La eutanasia se realizó mediante sedación con vapores de éter dietílico, exsanguinación y dislocación cervical, según establecen las directrices sobre la eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (12). Además, durante todo el estudio se respetaron los principios éticos para el uso de animales de laboratorio en experimentación (12,13).

El diseño y la conducción de la investigación se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB.

- *Estudios anatomopatológicos*

Posterior a la eutanasia, se les realizó una necropsia completa a 10 animales (cinco de cada sexo) del grupo tratado, luego de la quinta administración; al resto de los animales se le realizó después de la última administración (día 14). Se examinaron el sitio de administración, la superficie externa del cuerpo, todos los orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Se determinó el peso corporal *post mortem* y rápidamente se pesaron los pulmones y el encéfalo. Se determinó el peso relativo de los órganos por medio de la fórmula (peso de órgano/peso *post mortem* × 100).

Los encéfalos, los pulmones, la tráquea, las glándulas salivares, los ganglios cervicales, así como las hipófisis, tiroides, lengua, ojo con glándula harderiana y sitio de administración (tres niveles de fosas nasales) se preservaron para examen histopatológico en los órganos en los que se observara alteraciones macroscópicas en la necropsia (11). Las muestras de tejidos se fijaron con formaldehído al 10 % neutralizado; luego se procesaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las observaciones se realizaron con un microscopio convencional (Olympus CH-2, Japón).

Para la identificación por Anatomía Patológica de alguna lesión, se extrajeron las estructuras nasales; las cabezas sin piel fueron sometidas a un lavado con solución de cloruro de sodio al 0,9 % y procesadas como se describió anteriormente. Posteriormente, se descalcificaron en una solución de ácido fórmico (45 %) y citrato de sodio (20 %) durante 14 días; después fueron seccionadas adecuadamente en tres niveles cada una.

- *Análisis estadístico*

Se creó una base de datos y se procesaron los mismos utilizando el paquete estadístico IBM SPSS

Statistics versión 22. Como criterio de significación estadística, se aplicó $p \leq 0,05$. Para el peso corporal y el peso de los órganos *post mortem*, se realizó una comparación de medias a través de la prueba T de Student para muestras independientes y se calculó la desviación estándar (DE). La normalidad se determinó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el caso de los hallazgos histopatológicos, se construyó una tabla de contingencia y se utilizó la prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Observación clínica*

En cada exploración clínica, durante todo el ensayo no hubo signos de toxicidad local en los animales en estudio, los que mantuvieron una adecuada actividad somatomotora. No se reportaron cambios ni manifestaciones de los signos clínicos referidos en el acápite de materiales y métodos. No existieron diferencias en el patrón de comportamiento de los animales del grupo tratado con respecto al grupo control. No hubo muertes, hecho que por sí solo destaca la no toxicidad sistémica y refuerza la seguridad del producto en ensayo, descrita por otros autores, aunque a través de otra forma de administración (14-16).

- *Peso corporal*

Se incrementó el peso corporal de los animales de ambos sexos y grupos durante todo el ensayo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,299$) entre los grupos (Figura 1 A y B).

El peso corporal es un indicador de gran importancia, pues está involucrado en una serie de cambios orgánicos en diferentes etapas de la vida. Es por ello que una variación en su valor sugiere algún efecto adverso, se considera significativa si hay una disminución de más de 10 % del peso corporal inicial (17) y este no es el caso.

El incremento del peso promedio semanal por grupo y sexo se pueden apreciar en la Tabla 1. El incremento del peso corporal es una de las variables que mejor revela el estado de salud general del animal y en este caso se demostró que el ritmo de crecimiento de los animales de ambos grupos se corresponde con los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie (18). Resultados similares reportan otros autores en la evaluación toxicológica de candidatos vacunales (19, 20) y productos naturales (21).

La media del peso corporal *post mortem*, encéfalo y pulmón por grupo y sexo, se muestran en las Tablas 2 y 3. Al igual que con el peso corporal cuando estaban vivos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Resultados que coinciden con los de otros estudios de toxicidad de productos por vía intranasal conducidos en ratas de la línea Sprague

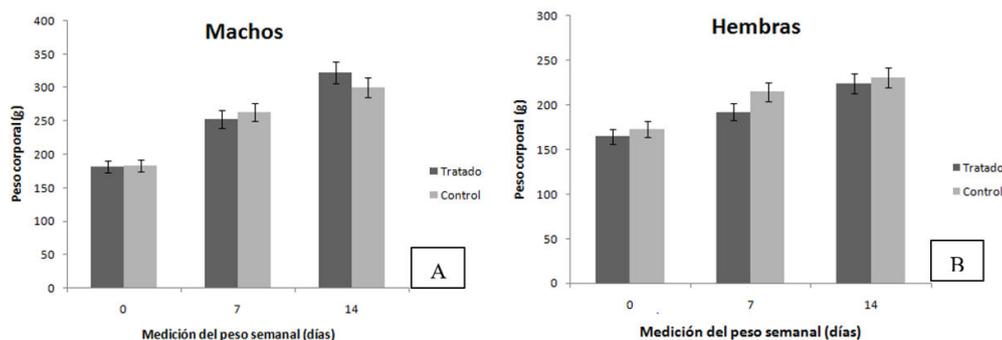


Figura 1. Peso corporal en machos (A) y hembras (B) por grupo de tratamiento. Tratado: SURFACEN®; Control: solución de NaCl 0,9 %. / *Body weight in males (A) and females (B) by treatment group. Treated: SURFACEN®; Control: 0,9 % NaCl solution.*

Tabla 1. Incremento de peso corporal promedio semanal por grupo y sexo. / *Weekly average body weight increase by group and sex.*

Grupo/Sexo	Incremento PC primera semana (g) ± DE	Incremento PC segunda semana (g) ± DE
Tratado/machos (N=10)	70,96 ± 29,11	58,63 ± 36,34
Control/machos (N=5)	79,53 ± 10,69	37,80 ± 10,76
Tratado/hembras (N=10)	27,58 ± 3,18	33,16 ± 10,40
Control/hembras (N=5)	41,82 ± 6,33	15,83 ± 1,99

PC: peso corporal; DE: desviación estándar. Tratado: SURFACEN®; Control: solución de NaCl 0,9 %.

Tabla 2. Peso *post mortem* de pulmón y encéfalo por grupo y sexo. / *Post mortem lung and brain weight by group and sex.*

Eutanasia después de la 5 ^a administración			
Grupo/Sexo	Peso <i>post mortem</i> (g) ± DE	Pulmón (g) ± DE	Encéfalo (g) ± DE
Tratado/machos	238,55 ± 10,14	1,30 ± 0,09	1,93 ± 0,13
Tratado/hembras	184,33 ± 8,37	1,15 ± 0,15	1,73 ± 0,31
Eutanasia después de la última administración (día 14)			
Control/machos	287,56 ± 16,28	1,59 ± 0,11	1,77 ± 0,10
Control/hembras	222,57 ± 7,91	1,30 ± 0,09	1,83 ± 0,12
Tratado/machos	307,53 ± 17,38	1,56 ± 0,21	1,82 ± 0,13
Tratado/hembras	214,41 ± 5,19	1,24 ± 0,10	1,70 ± 0,08
Significación estadística (p)/ machos	0,051	0,134	0,319
Significación estadística (p)/ hembras	0,140	0,164	0,440

DE: desviación estándar. Tratado: SURFACEN®; Control: solución de NaCl 0,9 %.

Dawley, en condiciones de tenencia y manejo similares (22).

En las observaciones anatomopatológicas macroscópicas realizadas durante la necropsia, no se encontraron lesiones ni alteración morfológica en tejidos y órganos de interés toxicológico. Esto resulta válido para los dos grupos experimentales en ambos sexos. No obstante, se realizó el estudio histopatológico en muestras de los pulmones, encéfalo y de mucosa nasal (nivel 1, 2 y 3). Los hallazgos se describen en la [Tabla 4](#), donde se aprecia que no existieron diferencias estadísticas entre los grupos.

- *Estudios anatomopatológicos*

Hubo animales que tuvieron hipertrofia del tejido linfóide asociado a la nariz: en los del grupo tratado, la lesión fue en el tercer nivel de la fosa nasal; mientras que, el animal que presentó esta lesión en el grupo control, fue en el segundo nivel de la fosa nasal.

No se detectaron daños de interés diagnóstico asociados a la administración de SURFACEN®. En los pulmones de algunos animales se encontró una neumonía intersticial crónica focal moderada, que estuvo presente tanto en el grupo tratado como en el grupo control; la misma se caracterizó por el engrosamiento de los septos alveolares debido a la infiltración de células mononucleares, fundamentalmente linfocitos y macrófagos. Este hallazgo en el pulmón se asocia a patologías espontáneas asociadas a otras causas (23) y no precisamente al producto SURFACEN®.

En el sitio de administración de la sustancia en estudio (tres niveles de las fosas nasales), tampoco se observó daño. Los epitelios nasales mostraron una adecuada integridad estructural; no se detectó inflamación, congestión u otras alteraciones que indiquen presencia de irritabilidad.

En cuanto a la presencia de hiperplasia del tejido linfóide asociado a la nariz, aun cuando no hay dife-

Tabla 3. Peso relativo de pulmón y encéfalo por grupo y sexo. / *Relative lung and brain weight by group and sex.*

Eutanasia después de la 5 ^a administración		
Grupo/Sexo	Pulmón (g) ± DE	Encéfalo (g) ± DE
Tratado/machos	0,55 ± 0,03	0,81 ± 0,03
Tratado/hembras	0,62 ± 0,08	0,93 ± 0,15
Eutanasia después de la última administración (día 14)		
Control/machos	0,56 ± 0,07	0,62 ± 0,07
Control/hembras	0,58 ± 0,03	0,82 ± 0,06
Tratado/machos	0,51 ± 0,05	0,59 ± 0,04
Tratado/hembras	0,58 ± 0,05	0,80 ± 0,05
Significación estadística (p)/ machos	0,405	0,120
Significación estadística (p)/ hembras	0,219	0,049

DE: desviación estándar. Tratado: SURFACEN®; Control: solución de NaCl 0,9 %.

Tabla 4. Hallazgos histopatológicos en el sitio de administración (cornetes nasales), en la tráquea y en el pulmón por grupo. / *Histopathological findings at the site of administration (nasal turbinates), in trachea and lung, by group.*

Alteraciones	Grupo Control (N=10)	Grupo Tratado (N=20)
Sitio de administración (cornetes nasales)		
Hiperplasia del NALT (p=0,228)	1	6
Tráquea		
Reacción inflamatoria focal en lámina propia (p=0,333)	1	0
Pulmón		
Neumonía intersticial crónica focal moderada (p=0,259)	6	8
Hiperemia (p=0,103)	2	0
Hipertrofia del BALT (p=0,593)	1	3
Hemorragia focal (p=0,563)	1	1
Congestión hipostática (p=0,333)	1	0
Enfisema focal (p=0,749)	1	2

NALT: tejido linfoide asociado a la nariz (por sus siglas en inglés, *nose-associated lymphoid tissue*).

BALT: tejido linfoide asociado a bronquios (por sus siglas en inglés *bronchus-associated lymphoid tissue*)

Tratado: SURFACEN®; Control: solución de NaCl 0,9 %.

rencias significativas entre los grupos, sí apareció en mayor número de animales (30 %) en el grupo tratado que en el grupo control (10 %). Este resultado pudiera estar asociado a la administración repetida por vía intranasal de la sustancia en ensayo.

El tejido linfoide, asociado a la nariz, forma parte del sistema inmunitario de las mucosas; es una estructura linfoide que se desarrolla en algunos roedores después de la primera semana de nacimiento, tiene la forma de un cilindro de aproximadamente tres milímetros de longitud y descansa a ambos lados del tabique sobre el piso de la cavidad nasal. Se ha reportado que juega un papel muy importante en el sistema de defensa del tracto respiratorio alto en los roedores, y constituye una respuesta tanto local como sistémica, por lo que se considera un modelo muy efectivo para inducir inmunidad (24, 25).

La naturaleza de la interacción entre los antígenos, la mucosa nasal y el tejido linfoide asociado a la nariz depende de la composición, la dosis y la frecuencia de administración del antígeno, así como de la integridad del epitelio. La administración continua de sustancias por la vía intranasal con potencial antigénico es capaz

de degenerar respuesta de los linfocitos de la mucosa con la consecuente liberación de IgA y, como mecanismo compensatorio, puede llegar a producir hiperplasia del tejido linfoide asociado a la nariz (26).

CONCLUSIONES

La administración de dosis repetidas por vía intranasal de SURFACEN® no altera la morfología celular de la mucosa nasal, no causa daños histopatológicos en los órganos estudiados y no produce signos de irritación local, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Toxicología y Experimentación Animal del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), especialmente a: Lic. Yesenia Rivero Salgado, DMV. Daniel Jay Pérez, Ing. Consuelo González Triada, DMV Marivy Gutiérrez Machado y a la Dra.C. Iliana Sosa Testé, por la profesionalidad y calidad en su desempeño para el éxito de este trabajo.

FINANCIAMIENTO Y PATROCINADORES

Este estudio fue parcialmente financiado por el Programa de Biotecnología, Industria Farmacéutica y Tecnología médica, proyecto código PN385LH007-003.

REFERENCIAS

1. García Cases S, Caro Aragonés I, Aguinagal de Toya A, Gaspar Carreño M, Marquez Peiró JF. Dispositivos y guía de administración vía inhalatoria. *ILAPHAR Rev. OFIL*. 2017;27(1):31-46. Disponible en: <https://www.ilaphar.org/dispositivos-guia-administracion-via-inhalatoria/>
2. Bautista-Méndez R, Salinas-Lezama E, Bonola-Gallardo LJ, Pineda-Gudiño RD, Magdaleno-Maldonado GE. Selección en la diversidad de inhaladores: una actualización de bolsillo. *Neumol Cir Torax*. 2020;79(3):204-207. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.35366/96657>
3. Anderson S, Atkins P, Beackman P, Cipolla D, Clark A, Daviskas E, *et al*. Inhaled Medicines: Past, Present, and Future. *Pharmacol Rev*. 2022;74(1):48-118. Disponible en: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000108>
4. Díaz-Casañas E, Morilla Gúzmán A, Rodríguez Moya V, Barrese Pérez Y. Estrategia de desarrollo clínico para la evaluación de la eficacia y seguridad de SURFACEN®. *Rev Arch Med Camagüey*. 2019;23(4):455-463. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552019000400455
5. Díaz-Casañas E, Rodríguez Moya V, Montes de Oca Martínez N. Surfactante pulmonar: posible intervención frente al nuevo Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Rev Habanera Cienc Médi*. 2020;19:1-5. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/3361>
6. Blanco O, Ramírez W, Lugones Y, Díaz E, Morejón A, Rodríguez V, *et al*. Protective effects of Surfacen® in allergen-induced asthma mice model. *Int Immunopharmacol*. 2022;102. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108391>
7. Comisión Europea. Anexo 5 Parte B: Métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud. The Directive on Dangerous Substances. 2019. Disponible en: https://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/annex5b_es.pdf
8. Willson DF. Aerosolized Surfactants, Anti-Inflammatory Drugs, and Analgesics. *Respir Care*. 2015;60(6):774-790; Disponible en: <https://doi.org/10.4187/respcare.03579>
9. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. *Pharmacol Toxicol*. July 2005. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Guidance-for-Industry-Estimating-the-Maximum-Safe-Alert/8750b5d4c6564d44ac84826e3760f15ea0b836de>
10. Derelanko MJ, Auletta CS. Handbook of Toxicology. Third Edition 2014 ISBN 9781439890134. Published March 7, 2014 by CRC Press 1024 Pages 7 Color & 340 B/W Illustrations.
11. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. EMEA/ CHMP/SWP/2145/2000. 1-9. 2015, London.
12. Guías para la eutanasia de los animales 2020 AVMA. https://www.portalveterinaria.com/upload/202002070922022020_Euthanasia_Final_1-15-20.pdf
13. Aller Reyero MA, Rodríguez Gómez J, Rodríguez Fabiána G. Normas éticas para el cuidado y utilización de los animales de experimentación. *Rev Cirugía Esp*. 2000;67(1):10-13. <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-normas-eticas-el-cuidado-utilizacion-8848>
14. Morilla GA, Díaz-Casañas E, Ávila AY, Barrese PY, Fernández LO, Uranga PR. Seguridad del tratamiento con Surfacen® en recién nacidos pretérminos con síndrome de dificultad respiratoria. *Rev Cubana Pediatr*. 2019;91(2):1-14. Disponible en: <http://www.revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/700/315>
15. Barrese PY, Lim AN, Díaz-Casañas E, Uranga PR, Ávila AY. Evaluación de la seguridad del uso poscomercial del surfactante cubano, SURFACEN®, en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria aguda del adulto. *Neumol Cir Torax*. 2019;78(3):296-303. DOI:10.35366/NT193F
16. Rodríguez-Moya VS, Barrese-Pérez Y, Uranga-Piña R, Díaz-Pérez L, Verdecia-Sánchez L, Díaz-Casañas E. Seguridad del tratamiento con surfactante pulmonar en el síndrome de dificultad respiratoria aguda en niños. *Rev haban cienc méd* 2022; 21(1). <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4362>
17. Alemán C. Reference data base for the principal physiological indicators in species of laboratory animal. *Lab Anim*. 2000;34(1):358-378. DOI:10.1258/002367700780387741

18. Taconic Technical Library. [Homepage on the internet]. Cambridge: Taconic Sprague Dawley, Growth and Phenotyping Data; 2018. <http://www.taconic.com/rat-model/sprague-dawley>
19. Rosario Fernández LA, Tamargo Santos B, Batista Santiesteban N, Infante Bourzac JF, Sierra GonzálezVG, Arencibia Arrebola DF, *et al.* Estudio de tolerancia local de un candidato vacunal proteoliposómico contra *Leptospira* spp en el biomodelo *Mesocricetus auratus*. Theoria. 2012; 21(1):21-36. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29931769003>
20. Oliva-Hernández R, Fariñas-Medina M, Infante-Bourzac JF, Hernández-Salazar T, Núñez-Martínez D, Quintero-Pérez A, *et al.* Estudio de tolerancia local de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® en ratas Sprague Dawley. Evaluación a los 24 y 36 meses en estante VacciMonitor. 2019;28(1):9-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2019000100009&lng=es
21. Paixao A, Mancebo B, Regalado AI, Chong D, Sánchez LM. Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral del extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe). Rev Salud Animal. 2017; 39(2). <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RS A/article/view/895/876>
22. Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, Zayas C, *et al.* Ensayo de inmunogenicidad y toxicidad local del cocleato de *Neisseria meningitidis* en ratas Sprague Dawley. VacciMonitor. 2009;188(1):1-7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2009000100001
23. Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation. 4th Edition - October 7, 2011, Elsevier. United Kingdom. eBook ISBN: 9780444538611. Hardcover ISBN: 9780444538567. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/histopathology-of-preclinical-toxicity-studies/greaves/978-0-444-53856-7>
24. Draft OECD Guidance Document on Histopathology for inhalation toxicity studies, Supporting TG412 (Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day) and TG 413 (Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day). Version 28, September 2009. Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oced/oced-gd125.pdf>
25. Oros Pantoja R. Efecto del estrés sobre el tejido linfoide asociado a nariz en el ratón. 2011. <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12086>
26. Takaki H, Ichimiya S, Matsumoto M, Seya T. Mucosal Immune Response in Nasal- Associated Lymphoid Tissue upon Intranasal Administration by Adjuvants. J Innate Immun. 2018;10:515-52. DOI: [10.1159/000489405](https://doi.org/10.1159/000489405)

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Lianet Díaz Pérez: **Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Redacción del borrador original, Revisión y edición.** Wilma Alfonso Lorenzo: **Conceptualización, Redacción del borrador original, Revisión y edición.** Odalys Blanco Hidalgo: **Conceptualización, Administración del proyecto, Redacción del borrador original, Revisión y edición.** Elaine Díaz Casañas: **Conceptualización, Administración del proyecto, Análisis formal, Redacción del borrador original, Revisión y edición.** Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el texto final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)