

Método clásico y alternativos en el ensayo de pirógenos.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2**}

¹ Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

² Licenciado en Microbiología.

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

** Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En esta carta al editor se destaca el uso de los métodos *in vivo* e *in vitro* (alternativos), para la evolución de la pirogenicidad de medicamentos, vacunas etc. Dentro de los métodos *in vivo* se destaca la prueba de oro de la pirogenicidad o llamado ensayo de pirógenos en conejos y dentro de los métodos alternativos se destacan la LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*), el ensayo en monocitos humanos aislados, líneas celulares de monocitos y el ensayo en sangre total. Además se han validado las técnicas en sangre humana citosina 1 (IL-1), sangre humana citosina 6 (IL-6), PBMC IL-6 (células mononucleares de sangre periférica), MM6 IL-6 (líneas celulares de monocitos humanos MONO MAC 6) y sangre humana criopreservada citosina 1 (IL-1).

Palabras clave: Ensayo de pirógenos, métodos alternativos, ensayo en sangre total.

Abstract

Classic and alternative methods in the pyrogen assay.

In this letter to the editor stand out the use of the *in vivo* and *in vitro* (alternatives) methods, for the pyrogenicity evolution of medications, vaccines. Inside the *in vivo* methods stands out the gold test of the pyrogenicity or call rabbits pyrogen assays and inside the alternative methods stands out the LAL (*Limulus* Amebocyte Lisate), the human monocites isolated assay, cellular lines of monocites and the blood total assays. Also have been validated the techniques in blood human cytosine 1 (IL-1), blood human cytosine 6 (IL-6), PBMC IL-6 (monocytic cells line of peripheral blood), MM6 IL-6 (human monocytoid cell line MONO MAC 6) and cryopreserved whole blood citocyne 1 (IL-1).

Key words: Pyrogen assays, alternative methods, blood total assays.

Desarrollo

Las endotoxinas de las bacterias situadas en la parte externa de sus membranas provocan mecanismos de defensa caracterizados por la aparición de fiebre, por lo que se las conoce como pirógenos. El ensayo de pirógenos sirve para garantizar la seguridad de los fármacos administrados por vía parenteral.^{1, 2}

Existe un modelo animal bien utilizado y validado hace varios años:

Ensayo de pirógenos en conejo:

- 3 conejos 1,5 Kg.
- Tº rectal 38.9-39.8ºC.
- Administración en la vena de la oreja de 10 mL/Kg.
- Determinación temperatura 1-2-3 horas.
- Positivo si cada conejo presenta aumento > 0.6ºC o si la suma de los incrementos de temperatura es >1.4ºC.

Aún siendo este método *in vivo* de gran carga para la determinación de la pirogenicidad de un fármaco en particular, las autoridades regulatorias sobre todo aquellos que exigen las buenas prácticas para el uso animal, ejercen anualmente presión, lo que a traído como consecuencia el estudio y validación de técnicas *in vitro* que garanticen resultados fiables sobre este campo en particular, a continuación señalamos los métodos alternativos fundamentales:

Alternativas *in vitro*:³⁻⁵

1. LAL (*Limulus* Amebocyte Lisate o lisado de amebocitos de *Limulus*).
2. Monocitos humanos aislados.
3. Líneas celulares de monocitos.
4. Sangre total.

En la siguiente figura se puede observar el efecto de los LPS (lipopolisacáridos), componente de la estructura de la cápsula de numerosas bacterias la cual induce una respuesta inmune sobre el organismo desencadenando reacciones de pirogenicidad.⁶ Ver Figura 1.

En la siguiente imagen podemos observar el fundamento teórico en forma de diagrama de flujo de dos métodos uno *in vivo* y otro alternativo. Ver Figura 2

En la mayoría de los ensayo *in vitro* se buscan la determinación de citocinas fundamentales en sangre, que participan en el desencadenamiento del estado febril.

Determinación de citocinas en sangre total:

- 200 µL sangre total humana.
- 100 µL producto a ensayar.
- 900 µL suero fisiológico estéril.
- Se someten a un periodo de centrifugación e incubación de 8-20 horas.
- Se determinan los niveles de la interleuquina 6 (IL-6) por el método de ELISA.

En el siguiente gráfico podemos observar una recta patrón de comportamiento normal de la IL-6.⁷ Ver Gráfico 1.

Métodos validados:

1. Sangre Humana IL-1.
2. Sangre Humana IL-6.
3. PBMC IL-6.
4. MM6 IL-6.
5. Sangre Humana Criopreservada IL-1.

En cuanto a los métodos validados por la ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) 1 y 2, se determinan según la técnica descrita con anterioridad en la determinación de las citosina en sangre total, la PBMC IL-6 es la determinación de la IL-6 en células mononucleares de sangre periférica, MM6 IL-6 es una prueba de pirógenos utilizando las líneas celulares de monocitos humanos MONO MAC 6, y por último el método de sangre humana criopreservada el cual te permite realizar a largo tiempo la determinación de la interleuquina 1 (IL-1).⁶⁻⁹

Estos métodos validados existentes permiten detectar pirógenos inducidos por endotoxinas Gram-negativas pero no otro tipo de pirógenos. Estos métodos se pueden considerar como reemplazo total del ensayo de pirógenos.

Figura 1. Efecto del LPS sobre el organismo.

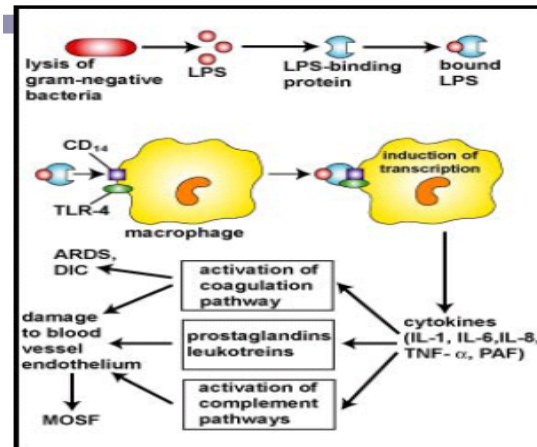


Figura 2. Fundamento teórico de 2 pruebas de pirógenos.

Fundamento

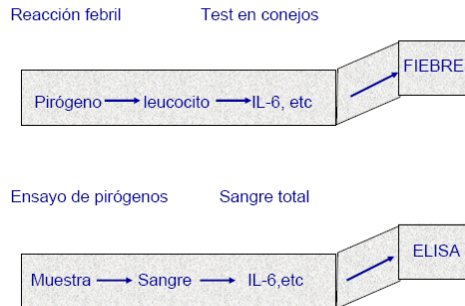
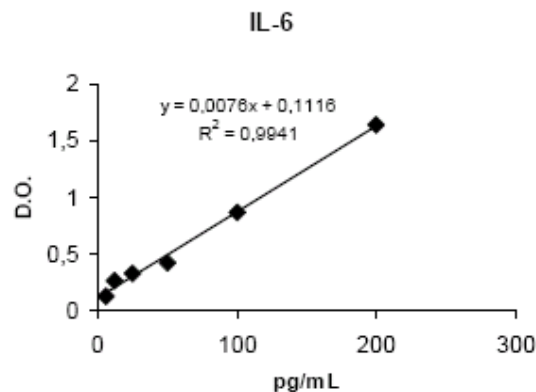


Gráfico 1. Recta patrón IL-6 en sangre total humana.



Referencias Bibliográficas

1. Bangham D.R. Relevance and standardization in pyrogen tests. *Journal de Pharmacie de Belgica* 1979; 34(3):134-136.
2. Zaldivar R.A, Haning J.P. Two different modes of carrying rabbits for the antibiotic pyrogenicity test. *Journal of the Parenteral Drug Association* 1978; 32(6):295-297.
3. Spielmann H, Hoffman S, Peterbauer A, Schindler S. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *Journal of Immunological Methods* 2005; 298(1-2):161-173.
4. Hartung T, Wendel A. *In vitro* methods of pirogenes quantification. *In vitro Toxicol* 1996; 9(4):353-354.
5. Martínez V, Mitjans M, Vinardel M.P. Alternativa al ensayo de pirógenos en conejos mediante la cuantificación de IL-6 en sangre humana. *Revista de Toxicología* 2003; 20(2):18-20.
6. Alt-tox. Non-animal Methods for Toxicity Testing. Pyrogenicity. Alt-tox.org; 2009.p.1-2.
7. Schindler S, Hartung T. Comparison and validation of novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *Developmental Biology (Basel)* 2002; 111:181-186.
8. European Commission. Institute for health and consumer protection. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Statement on the validity of *in-vitro* pyrogen tests; 2006.p.2-3.
9. Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *Journal of Immunological Methods* 2005; 298(1-2):161-173.

Recibido: 09/10/09

Aceptado: 23/10/09