

Consideraciones sobre el diseño para las evaluaciones toxicológicas requeridas en un nuevo adyuvante vacunal.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{},
Tamara Hernández Salazar^{*}, Yulieé López Feria^{*}, Mildrey Fariñas Medina^{*},
Daiyana Díaz Rivero^{*}.**

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

^{**}Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola, email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

Los estudios toxicológicos de nuevos adyuvantes vacunales deben realizarse según las recomendaciones de las líneas directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OCDE) o la Agencia de Medicina Europea (EMA). En nuestros días se destaca el uso de adyuvantes en la mayoría de los candidatos vacunales, como potenciadores de la respuesta inmunológica, pero por lo general los adyuvantes existentes presentan efectos adversos e indeseables, sobre todo de índole tóxica, resultados que han servido para afirmar por varios conocedores y estudiosos de esta materia que para ellos no existe el adyuvante ideal. Esta revisión tiene como objetivo realizar un diseño para las evaluaciones toxicológicas requeridas en un nuevo adyuvante vacunal. Tuvimos en cuenta los ensayos para determinar la toxicidad por dosis única, por dosis repetida, tolerancia local, evaluaciones de toxicología de la reproducción, toxicología especial la cual incluye genotoxicidad y mutagénesis, y por último el ensayo de pirógenos. Son numerosas las evaluaciones a llevar a cabo para poder registrar y validar un nuevo adyuvante, las cuales permiten determinar el efecto tóxico a todos los niveles posibles, esto a nuestro criterio ha servido para disminuir el riesgo a efectos indeseables de las vacunas utilizadas en humanos y en los animales.

Palabras clave: Diseño, toxicología experimental, ensayos, evaluaciones, nuevo adyuvante.

Abstract

Considerations about the design for the toxicological evaluations required in a novel vaccine adjuvant.

The toxicological studies of novel adjuvants vaccine, they should be carried out according to the recommendations of the lines guidelines of the Organization for the Cooperation and Development (OECD) and European Medicines Agency (EMA). In our days it stands out the adjuvants use in most of the vaccine candidates, as enhancers of the immune response, but in general the adjuvants exist, presents adverse and undesirable effects, mainly of toxic nature, results that they have been good to affirm for several experts and studios of this matter that for them the ideal adjuvant doesn't exist. This review has as objective to carry out a design for the toxicological evaluations required in a novel vaccine adjuvant. We kept in mind the assays to determine the toxicity for unique dose, for repeated dose, local tolerance, evaluations of reproduction toxicology, special toxicology which includes genotoxicity and mutagenesis, and lastly the pyrogen assay. They are numerous the evaluations to carry out to be able to register and to validate a novel adjuvant, which allow determining the toxic effect at all the possible levels, this to our approach has been to diminish the risk to undesirable effects of the vaccines used in human and animals.

Key words: Design, experimental toxicology, assays, evaluations, novel adjuvant.

Introducción

Los estudios toxicológicos de nuevos adyuvantes vacunales deben realizarse según las recomendaciones de las líneas directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OCDE) o la Agencia de Medicina Europea (EMA). En caso de no ser así, deberá suministrarse una justificación fundada. Así mismo, en caso de que un estudio requerido no se haya realizado, deberán justificarse científicamente las razones para ello. Los informes y los estudios deberán realizarse bajo garantías de calidad y siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Debe incluir siempre en todos los ensayos como premisa fundamental, un grupo donde se evalué la dosis inmunológica que será la dosis en la cual el adyuvante se incluirá en la formulación, así como una dosis alta por lo general se calcula por el volumen máximo permisible a administrar a la especie en ensayo según la vía. Además debe incluir un grupo en el cual interactúe el adyuvante con la formulación tanto en la dosis en la que será utilizado en los estudios preclínicos como en la dosis alta como el mayor volumen permisible para la especie utilizada en el ensayo según la vía. De esta forma determinará si el adyuvante es tóxico por sí solo o si es tóxico o se potencia su toxicidad una vez que se encuentra en la formulación.¹

En nuestros días se destaca el uso de adyuvantes en la mayoría de los candidatos vacunales, como potenciadores de la respuesta inmunológica, pero por lo general los adyuvantes existentes presentan efectos adversos e indeseables, sobre todo de índole tóxica, resultados que han servido para afirmar por varios conocedores y estudiosos de esta materia que para ellos no existe el adyuvante ideal.²

En general, los antígenos solubles puros, recombinantes o sintéticos han resultado seguros, pero con una menor inmunogenicidad en comparación con aquellos del organismo de origen. Es por eso que la búsqueda de adyuvantes nuevos y atóxicos, así como el desarrollo de nuevos sistemas de envío de antígenos, son necesidades de la investigación en el campo de las vacunas. El desarrollo de vacunas efectivas contra la gran cantidad de patógenos que permanecen en las superficies mucosales o que tienen en ellas su puerta de entrada, requiere

adyuvantes que potencien respuestas locales. Otras razones económicas y logísticas apoyan el desarrollo de adyuvantes para las vacunas mucosales.³

En la actualidad, existe un número creciente de reportes sobre el uso de diferentes adyuvantes y sobre estrategias de adyuvación para vacunas basadas en la inoculación de ADN, lo que incrementa sus potencialidades profilácticas y terapéuticas. Los adyuvantes también se han utilizado como elementos indispensables en las estrategias novedosas de vacunación contra enfermedades alérgicas, autoinmunes y contra el cáncer, lo que, sin dudas, abre nuevas posibilidades en el desarrollo de vacunas.⁴

Esta revisión tiene como objetivo realizar un diseño para las evaluaciones toxicológicas requeridas en un nuevo adyuvante vacunal. Tuvimos en cuenta los ensayos para determinar la toxicidad por dosis única, por dosis repetida, tolerancia local, evaluaciones de toxicología de la reproducción, toxicología especial la cual incluye genotoxicidad y mutagénesis, y por ultimo el ensayo de pirógenos.

Desarrollo

Definición: Adyuvante es definido por el aumento de la inmunogenicidad. No obstante, son imprescindibles dos aspectos, el primero es incrementar comprensión de la respuesta inmune innata y el segundo se basa en analizar los avances en el procesamiento y presentación antigénica.⁵

Clasificaciones de los adyuvantes: ⁴⁻⁶

- Particulados y no particulados.
- Por su origen (no bacterianos, bacterianos, mediadores del huésped, anticuerpos anti-idiotípicos vectores vivos y conjugados).
- Sales de aluminio, agentes surfactivos, polianiones, derivados bacterianos, citocinas y vehículos y materiales de liberación lenta.
- Hidrófobos y productores de citocinas, Vehículos, Facilitadores independientes de adyuvantes y Formulaciones.
- Por sus fuentes principales: botánico, bacteriano, químicos, citocinas y hormonas.

- Por sus mecanismos principales de acción: sistemas de liberación antigénica y adyuvante inmuno-estimuladores.
- Por su estructura y fuentes son clasificados en 11 clases de adyuvantes.
- Actualmente, el efecto Adyuvante *in vivo* puede ser dividido en dos componentes: Sistema de Liberación e inmunopotenciadores.

Toxicidad:

1. Toxicocinética.

Se deberá informar sobre la absorción, la distribución tisular, el metabolismo y la excreción del adyuvante. La información podrá proceder de documentación bibliográfica o de estudios realizados en animales de laboratorio. En el caso de estudios metabólicos, se pueden realizar también estudios *in vitro*.⁷

2. Toxicidad por dosis única:

En dos especies una roedora y una no roedora preferiblemente rata o ratón como roedores y el conejo como no roedor, en ambos casos se deben utilizar animales adultos jóvenes. Debe ser evaluado por dos vías en primer lugar la vía en que será administrado a los animales y al hombre es decir en estudios preclínicos y clínicos y la otra vía se propone cualquier vía parenteral preferiblemente la intraperitoneal (I.P).⁸

La inoculación se realiza una sola vez y por lo general se forman de 3 a 4 grupos experimentales, incluyendo 3-5 animales/sexo/grupo, administrados durante un período de 14 días, durante este tiempo los animales son pesados en dos ocasiones a los 7 días de administrado el inoculo y a los 14 días, el consumo de alimento debe realizarse diario. Finalizados los 14 días se sacrifican todos los animales y se les realiza el análisis anatomopatológico para observar posibles lesiones en cavidades y órganos, de observar al análisis macro alguna lesión debe tomar muestra y enviarlas a histopatológica.⁹

Diariamente debe anotar los síntomas y signos indicativos de toxicidad, pues para que un adyuvante o sustancia en general a evaluar sea clasificada como tóxica desde el 2002, no es necesario que en este tipo de estudios los animales mueran, ya que desde abril del 2002, se incluyó el término de toxicidad evidente mediante el cual surgieron un número considerable de variantes para evaluar la toxicidad aguda encaminados a disminuir el número de animales y

refinar los procedimientos. Este estudio le permitirá definir dosis-respuesta, órganos dianas según el nivel de daño o lesión, así como permitirá definir las dosis para estudios de toxicidad por dosis repetidas en casos de proceder.

3. Estudio de toxicidad por dosis repetidas durante 28-45 días en roedores (subagudo, preferiblemente pre-púberes) o el estudio subcrónico durante 90 días, igualmente en una sola especie roedora:

Este estudio solo se realiza en los casos en que el adyuvante que va incluido en la formulación vacunal se vaya a administrar más de una vez, es decir que se necesite en el esquema de vacunación la reactivación de la vacuna. El tiempo mínimo requerido de duración de este tipo de estudio es de 21 días. El cual se realiza según las líneas directrices OCDE 407 (o equivalentes) o cualquier estudio publicado, realizado según las exigencias científicas más recientes, que permita evaluar la inocuidad o clasificación toxicológica del nuevo adyuvante.¹⁰

En este ensayo se utilizan ratas o ratones de ambos sexos, según el biomodelo ideal en sus ensayos de inmunogenicidad. Se forman 4 grupos experimentales, de 5 animales/sexo/grupo, se administran en dosis repetidas y son sacrificados de forma escalonada par determinar el nivel de toxicidad según el tiempo sacrificándose a los (7, 14, 21, 28 y 45 días en el esquema subagudo y en el caso de la sobcrónica se incluye a los 60, 75 y 90 días o final). Dentro de las evaluaciones que debe realizar se encuentran dos observaciones diarias determinando la temperatura corporal, pesaje semanal, consumo de alimento y de agua 2 determinaciones en la semana, bioquímica sanguínea al menos 10 determinaciones con el uso de marcadores enzimáticos que determinen la presencia o no de daño en diferentes órganos, hematología al menos 10 determinaciones incluyendo los niveles de IgG, IgM y de citoquinas.¹¹ Además se examinaran los órganos y cavidades en el examen anatomopatológico y se someterán al análisis histopatológico preferiblemente el grupo control y la dosis más alta a evaluar, sobre todo se analizaran los órganos inmunitarios incluyendo los nódulos linfáticos, médula ósea y órganos parenquimatosos. Se determinara la relación peso de órganos/peso corporal como parámetro indicativo de toxicidad.

Hemos de destacar que para el caso de los estudios de dosis repetidas solo es necesario un solo estudio, usted elegirá según sus condiciones y lo que quiera investigar según el adyuvante a evaluar que esquema utilizar.

4. Tolerancia local:

Este estudio por lo general lo puede incluir dentro de los ensayos de dosis repetida en redores, en los cuales debe buscar el efecto local en el lugar de la inoculación del adyuvante, sobre todo se realizan mediciones de la piel para determinar el aumento o no de ésta, se observa y se describe la zona específica y contigua al punto de inoculación y al sacrificarse se toma el tejido de esta zona para ser analizado histológicamente. También para el caso de adyuvantes se debe analizar por histoquímica los nódulos linfáticos cercanos a la zona de inoculación y su relación con la reatogenicidad local describiéndose la zona afectada según el tipo de patología presente y las células del sistema inmune involucradas.¹²

5. Toxicología de la reproducción:

Debe realizar la evaluación en los tres segmentos de la reproducción y preferiblemente en ratas en caso de fertilidad y estudio peri-postnatal, para el caso de la teratogénesis debe ser en dos especies preferiblemente en la rata y el conejo, se justifica siempre y cuando el adyuvante se vaya a utilizar en formulaciones vacunales que serán administradas a niños, mujeres y hombres en edad fértil, pero como por lo general al crearse un nuevo adyuvante se desconoce cual será su uso o si otros investigadores lo utilizaran en otras formulaciones entonces es obligatorio realizar la evaluación en todos los segmentos de la reproducción, los cuales son:

***Segmento I, Fertilidad:** Permite evaluar la etapa de pre-implantación del embrión (del pre-apareo a la concepción y de la concepción a la implantación), por lo general se forman 4 grupos de 20 hembras en cada uno. En este estudio debe administrar el adyuvante al menos 2 semanas antes del apareo y durante el apareo en los machos, para las hembras dos semanas antes del apareo y durante el apareo hasta el día 13-15 de la gestación.¹³ Durante este tiempo se evaluará el peso corporal y el consumo de agua y alimento semanalmente, menos en la etapa de apareo. Una vez quedado gestante la hembra los machos se sacrificaran y se les observará sobre todo al análisis anatomopatológico los órganos sexuales de los cuales se

tomará muestra para analizar su integridad de forma histológica, así como se analizará la concentración espermática y la integridad de los espermatozoides en los epidídimos.¹⁴ Las hembras se pesaran para determinar el aumento de peso-gestación y se les determinará el consumo de agua y alimento durante la gestación, al llegar al día 13-15 de la gestación serán sacrificadas bajo atmósfera de éter y analizados, los fetos como vivos o muertos, número de absorciones tempranas y tardías, número y posición de las implantaciones, número de cuerpos lúteos/ovario y número de fetos/cuerno, peso del útero, así como el número de hembras preñadas como índice de fertilidad y la longitud del ciclo estral.

***Segmento II, Toxicidad peri y post- natal:** Por su parte el estudio de los efectos sobre el desarrollo pre y postnatal, detecta los efectos tóxicos en la hembra durante la preñez y la lactancia y aquellos producidos en las crías por la exposición de las madres desde la implantación hasta el destete. Este y el anterior estudio se realizan al menos en una especie, preferiblemente la rata. Por ende el adyuvante debe ser inoculado durante ambas etapas, destacándose sobre todo la posible toxicidad presente en el recién nacido hasta el destete a partir de la inoculación de la madre. Para este tipo de estudio se tienen en cuenta dos diseños, en el primero por lo general los investigadores seleccionan al azar un macho y una hembra de cada camada, por cada hembra parida de las 20 hembras que con anterioridad formo los grupos en el diseño experimental del estudio durante el apareo y la preñez, otros hacen una reducción de camada, teniendo en cuenta que la rata paré alrededor de 12-16 crías, toman 8 crías de cada camada seleccionadas al azar, las cuales serán las analizadas.¹⁵ Luego en ambas variantes se procede a marcarlos para permitir su futura identificación. Las crías seleccionadas serán usadas para todos los estadios de evaluación a menos que ocurra la muerte, en cuyo caso se seleccionara una cría de reemplazamiento de la misma camada. El desarrollo de las crías debe ser evaluado los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21, considerando como día 0 el día de su nacimiento.

Se evalúa en el recién nacido el desarrollo físico (separación del pabellón de la oreja, crecimiento del pelo, erupción de los incisivos, abertura de las orejas, separación de los párpados, descenso de los testículos y abertura de la vagina, a su vez se evalúa el desarrollo sensorial (respuesta auditiva, respuesta visual, reflejo pupilar, reflejo corneal, reflejo parpebral

y el reflejo ipsilateral flexor), y por último se analiza el desarrollo motor (enderezamiento en superficie, enderezamiento en el aire, geotaxis negativa, desarrollo locomotor, actividad locomotora y el desarrollo del comportamiento en campo abierto).¹⁶ Al final del estudio tanto las madres como las crías son sacrificadas y se les debe realizar el análisis anatomopatológico macro y micro de órganos y cavidades. También se determina el tiempo o duración de la lactancia en las hembras.

***Segmento III, Teratogénesis:** Este estudio se debe realizar en ratas y en conejos no consanguíneos, formándose 5 grupos, pues debe incluir un control positivo (teratogéno conocido) administrado en las ratas solamente el día 15^{to} de la gestación y en conejos debe ser administrado el día 18^{avo} de la gestación. Se incluyen 10-20 hembras/dosis. En primera instancia se aparean hembras y machos, luego de ser confirmada la gestación o preñez en el caso de las ratas debe ser administrado el adyuvante desde el día 6^{to} hasta el día 15^{to} de la gestación para simular el consumo humano durante los dos primeros meses de la gestación (organogénesis), en el caso del conejo serán administradas desde el día 6^{to} hasta el día 18^{avo} de la gestación.¹⁷

Las ratas serán pesadas diariamente y se registrará el peso de los días 0-6, peso del día 6-15, peso del día 15-20 y el peso del día 0-20 de la gestación. El consumo de alimento se controla durante los días de tratamiento de la sustancia a prueba. En el caso de los conejos se registra el peso del 0-6, peso del día 6-18, peso del día 18-29 y el del día 0-29.¹⁸

El día 20 de gestación las ratas, son sacrificadas por inhalación de éter, en el caso de los conejos es el día 29 y son sacrificadas por dislocación cervical. En ambas especies se realizan las cesáreas y se registran los siguientes indicadores: número de hembras apareadas, número de hembras preñadas, abortos, madres con fetos viables, madres con reabsorciones totales, mortalidad materna, cuerpos lúteos, implantaciones, reabsorciones tempranas, tardías y el total, número de fetos muertos, fetos vivos, pérdidas pre-implantación, pérdidas post-implantación, proporción de sexos (M/H), peso de los fetos (g) y número de fetos malformados. Además se buscan malformaciones externas con el uso del estereoscopio destacando el número de fetos examinados, incidencia de fetos con malformaciones (%), número de fetos con malformaciones, agénesis de la cola, agénesis del ano, animales con

sindactilia, etc, cola enroscada y retraso del desarrollo ocular y ótico, micrognatia y protusión de la lengua y hernias abdominales entre otras.¹⁹

En nuestras investigaciones por lo general aproximadamente el 50% de los fetos los fijamos en alcohol para el examen del esqueleto después de teñirse con rojo de alizarina S según la técnica modificada de Dawson, a fin de visualizar alteraciones esqueléticas, destacando el número de fetos examinados, la incidencia de fetos con malformaciones (%) y el tipo de malformación, así como el % de existencia de cada una de esas malformaciones. A los restantes fetos se les realiza un examen visceral después de ser fijados en Bouin, para detectar alteraciones viscerales, registrándose el número de fetos examinados, incidencia de fetos con malformaciones (%), incidencia de fetos con variaciones (%), número de fetos con variaciones, esternibras rudimentarias, asimétricas, dumbbell, pobremente osificadas o sin osificar, etc, costillas supernumerarias y otras de ser observadas.²⁰ (Ver Figura 1)

6. Toxicología especial (genotoxicidad y mutagénesis):

El producto a evaluar como nuevo adyuvante según sea el caso, debe ser evaluado en ensayos de mutagénesis y genotoxicidad a diferentes niveles de daño al ADN:

Daño en la estructura primaria del ADN: Para lo cual se evalúa en el ensayo cometa *in vitro* o *in vivo*. En general el principio básico del ensayo, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas. En el caso de realizar el estudio en la variante *in vitro* el más recomendado y utilizado es el alcalino, debe montar dos muestras por cada grupo declarado en su diseño experimental. Si decide evaluar este ensayo en la variante *in vivo* debe utilizar como biomodelo experimental el ratón a razón de 5 animales/sexo/grupo, evaluado en dosis única o repetida según sea el esquema para lo cual esta diseñado el nuevo adyuvante, de ser en dos dosis debe esperar luego 14 días, y posterior al mismo puede sacrificar los animales para obtener sangre periférica y con esta realizar el ensayo.²²

Daño a nivel de genes: Llamado mutación reversa en bacterias, fundamentalmente es útil el ensayo de Ames. Método en el cual se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por corrimiento del marco de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases del ADN. Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina.²³ Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (his), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Por lo general se forman 6 grupos experimentales 3 de la muestra problema o adyuvante, 1 grupo control negativo, y dos grupos controles positivos, un mutágeno reconocido que actué como pro-mutágeno es decir en el cual se adicione mezcla S9 durante el proceso y un mutágeno real evaluándose sin mezcla S9 ya que el mismo es capaz de ejercer su función mutagénica sin ser metabolizado. En cada grupo experimental debe montar 2 placas (original y una replica), para obtener resultados de promedios entre ambas.²⁴

Daño a nivel de cromosomas in vitro: Detecta efectos cromosomales en células de mamíferos. Existen varias variantes, pero en nuestros días la más utilizada es el ensayo de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica humana. Este ensayo tiene por objetivo detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo. El ensayo de aberraciones cromosómicas detecta cambios en la estructura de los cromosomas, que son visibles al microscopio óptico. Estos cambios corresponden a roturas y reordenaciones dentro de un cromosoma o entre cromosomas diferentes. Estas reorganizaciones son producidas sobre todo por aquellas sustancias que rompen directamente la cadena de ADN (radiaciones ionizantes) o que distorsionan la doble hélice de ADN (agentes intercalantes).²⁵ Las aberraciones cromosómicas pueden ser de dos tipos atendiendo al momento del ciclo celular en el que tenga lugar la exposición: aberraciones de tipo cromatídico (afectan a una sola cromátida del cromosoma) y aberraciones de tipo cromosómico (afectan a ambas cromátidas del cromosoma). En este ensayo debe formar igualmente que el anterior 6 grupos experimentales, distribuidos de la misma forma, pero en este caso debe realizar dos variantes la acción aguda en un periodo corto de tiempo y la

crónica donde el adyuvante es expuesto al cultivo durante un tiempo y luego es lavado el cultivo para poner a crecer células que estuvieron expuestas a él.²⁶

Daño a nivel de cromosomas *in vivo*: Estudio *in vivo* que permite detectar efectos cromosomales en células hematopoyéticas y otras de roedores. Existen ensayos ya validados tales como el de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea, aberraciones cromosómicas en espermatogonias y el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea el cual dado por su alta sensibilidad, bajo costo y demás ventajas es el más difundido. Este ensayo es una prueba *in vivo* ampliamente validada que permite detectar agentes que causan tanto rupturas cromosómicas y cromatídicas como pérdidas de cromosomas completos, al afectar el huso mitótico. Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas acéntricos o completos que espontáneamente o por causa de determinados agentes que ocasionan lesiones citogenéticas, dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados durante la anafase.²⁷ Se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea de ratones. En este ensayo debe formar 5 grupos experimentales 3 del adyuvante a evaluar, 1 grupo control negativo y 1 grupo control positivo el cual sea reconocido como clastogénico y citotóxico, 5 animales/sexo/grupo preferiblemente ratones. Se plantea que al administrar el adyuvante u otra sustancia a evaluar debe esperar de 48 horas a 5-7 días para ser analizadas las células.²⁸

Daño a nivel celular: Dentro de este grupo se encuentra el ensayo de la morfología de la cabeza de los espermatozoides de ratón y rata. Esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoides al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas.²⁸⁻³⁰ En este ensayo se utilizan ratones machos adultos

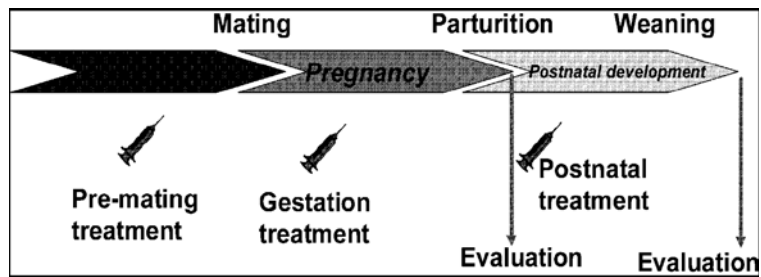
jóvenes 10 animales/grupo, y luego de ser administrado el adyuvante sea en dosis única o repetida, debe esperar que pase una ciclo espermático completo para que se fije la mutación en caso de existir, este ciclo en los ratones dura 35 días y en la rata 52 días. Debe utilizar igualmente una sustancia como control positivo, que sea mutágeno y citotóxico a las células germinales, tal es el caso de la ciclofosfamida.³¹

El diseño experimental de todos estos ensayos, así como las estrategias para su uso, los pueden encontrar de forma más detallada en el artículo titulado "Estrategias en las evaluaciones genotóxicas", en la revista Retel (Revista de toxicología en línea, número 23 (4), de octubre del 2009).³²

8. Ensayos de pirogenicidad:

Existen métodos *in vivo* e *in vitro* para determinar la pirogenicidad de adyuvantes vacunales y/o vacunas.³³⁻³⁶ Dado lo caro que resultan los ensayos *in vitro* se recomienda realizar el ensayo clásico de pirogenicidad además de dada su alta fiabilidad es nombrado la prueba de oro en este tipo de ensayo, para lo cual se inocula el adyuvante en la vena de la oreja en conejos en un volumen máximo permisible de 10 mL/Kg a 3 conejos de 1,5 Kg de peso vivo, los cuales deben tener una temperatura rectal fisiológica de 38.9-39.8°C. Se determina la temperatura en intervalos de 1-2-3 horas.³⁷ Se da como resultado positivo si cada conejo presenta un aumento >0.6°C o si la suma de los incrementos de temperatura es >1.4°C. Igualmente para corroborar sus resultados anterior a la prueba pudo haber extraído sangre periférica y haber determinado los niveles de la interleuquina 1 y 6 (IL-1, IL-6) antes de la inoculación y luego determinarla a estos intervalos post inoculación.^{36, 37}

Figura 1. Esquema de inoculación según el segmento a evaluar.²¹



Referencias Bibliográficas

1. Bomford R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? In: Brown F, Haaheim LR, editors. Modulation of the immune response to vaccine antigens. Dev Biol Stand Vol 92. Basel: Karger, 1998; p. 13-18.
2. Vogel FR. Adjuvants in perspective. In: Brown F, Haaheim LR, editors. Modulation of the immune response to vaccine antigens. Dev Biol Stand Vol 93. Basel: Karger, 1998; p. 241-248.
3. Aguilar JC, Leal MJ. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. Biotec Aplic 2000; 17(3):147-160.
4. Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. Molecular Biotec 2002; 21(2):129-148.
5. O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. Biomol Engineering 2001; 18(3):69-85.
6. O'Hagan DT, Valiente NM. Adjuvants classification. Nature Review 2003; 2:727-736.
7. Gopinath C. Pathology of toxic effects on the immune system. Inflamm Res 1996; 45:74-78.
8. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Fariñas M, Infante JF, Díaz D, Prieto JL. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel 2009; 22(1):1-15.
9. Kuper CF, Heer E, van Loveren H. Immune system. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. Handbook of toxicologic pathology, vol. 2. San Diego, New York: Boston Academic Press, 2002; p.585-647.
10. EMEA. European Medicines Agency. Note for guidance on repeated dose toxicity (CPMP/SWP/1042/99). 2000, <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/104299en.pdf>.
11. OECD. Guideline for the testing of chemicals 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, 1995; p.4-6.
12. EMEA. European Medicines Agency. Note for Guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products (CPMP/BWP/3088/99). 2001, <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/308899en.pdf>.

13. FDA, CBER,. Guidance for industry. Considerations for reproductive toxicity studies for preventive vaccines for infectious disease indications. 2000, p.35-36.
14. Descotes J. Immunotoxicity, reproduction and cancer: what are the issues? Toxicology 2003; 185:177-178.
15. Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. Vaccine 2001; 19:3331-3346.
16. Arencibia DF, Rosario LA, Ortiz L, Curveco D. Evaluación del desarrollo físico y funcional en ratas recién nacidas para su uso en estudios de toxicología perinatal y postnatal. Retel 2009; 22(2):16-28.
17. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Infante JF, Fariñas M, Díaz D. Algunas consideraciones sobre el uso de modelos animal en el ensayo de teratogénesis. Retel 2009; 21(2):22-36.
18. Rodríguez MD, Gámez R, González JE. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats. Food Chem Toxicol 2003;41:89-93.
19. Rodriguez MD, Gonzalez JE, Aleman C. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits. Food Chem Toxicol 2004; 42(12):1977-1985.
20. Friman M, González S, Fraga J, Domínguez Y, Oquendo D, Pérez C. Evaluación de la toxicidad embrionaria y fetal de la vacuna antileptospirósica vax-spiral. Anuario Toxicología 2001; 1(1):30-34.
21. Barrow PC. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. Toxicology 2003; 185(2):205-212.
22. Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. Mol. Biotech 2004; 26(2):249-261.
23. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.nat.Acad.Sci 1973; 70(2):281-285.
24. Arencibia DF, Rosario LA. Métodos de Conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. Retel 2009; 19(2):19-39.

25. Elliot BM, Combes RD, Elcombe CR, Gatehouse DG. Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in «In Vitro» Genotoxicity Assays. *Mutagenesis* 1999; 10(3):175-177.
26. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Poddar G. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res* 2003; 34(3):133-143.
27. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la (*Roystonea regia*), mediante el ensayo de micronúcleos. *Rev. Cubana de Farmacia* 2009; 43(2):8-9.
28. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1. *Retel* 2009; 24(2):7-29.
29. Wyrobek AJ. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.
30. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *Retel* 2009; 20(1):2-14.
31. Wyrobek AJ, Bruce WR. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*. Second edition, Vol 2, England: United Kingdom edition published, 1978; p.135-136.
32. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(4):23-40.
33. 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.
34. 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.
35. Alt-tox. Non-animal Methods for Toxicity Testing. Pyrogenicity. *Alt-tox.org*, 2009; p.1-2.
36. Arencibia DF, Rosario LA. Método clásico y alternativos en el ensayo de pirógenos. *Retel* 2009; 24(1):1-6.

37. Bangham DR. Relevance and standardization in pyrogen tests. Journal de Pharmacie de Belgica 1979; 34(3):134-136.

Recibido: 13/01/10

Aceptado: 25/01/10