

# Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI

Aníbal Domínguez<sup>1</sup>, Maibia Tamayo<sup>1</sup>, Irela Y. Pérez<sup>1</sup>, Hilario Salas<sup>1</sup>, Oliver Pérez<sup>2</sup>, Alexander Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Toxicología y Biomedicina. Autopista Nacional Km 1½. Apartado Postal 4033. Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

**email:** anibalodio@yahoo.com

---

Se realizó un estudio para evaluar el potencial citogenotóxico en células espermáticas de ratón, del adyuvante AFCo1 (Adyuvante Finlay Cocleato 1), obtenido a partir del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. El AFCo1 y su diluyente se administraron por vía intranasal en una dosis de 40 µL (1 mg/mL), mientras que los controles positivo (ciclofosfamida) y negativo (agua destilada estéril), se administraron por vía oral a razón de 40 mg y 1 mL/kg, respectivamente. Se utilizaron ratones (NMRI) de 8-12 semanas de edad, con peso corporal entre 27-30 g, a los cuales se les aplicaron cinco dosis con un intervalo de 24 h, durante los primeros cinco días del experimento. Se evaluó la toxicidad general (peso corporal) e indicadores testiculares de citotoxicidad testicular (concentración espermática) y genotoxicidad (morfología espermática). El AFCo1 y su diluyente no provocaron toxicidad general, citotoxicidad, ni genotoxicidad. La ciclofosfamida sí produjo citotoxicidad (47,77%) y genotoxicidad (534,61%). Se concluye que el AFCo1 y su diluyente pueden ser considerados como no tóxicos para las células espermáticas en el nivel de dosis y para el biomodelo animal utilizado.

**Palabras clave:** Células espermáticas, adyuvante, cocleato, *Neisseria meningitidis* B, ratón.

---

## Introducción

La espermatogénesis es un proceso eficiente e importante para la continuación de las especies, siendo una de sus características, la de ser resistente al daño. Este evento tiene lugar en los túbulos seminíferos, los cuales poseen una arquitectura histológica altamente organizada y preestablecida. Las células germinales indiferenciadas (espermatogonias) se hallan cerca de la membrana basal. A partir de ellas se desarrolla toda una generación de células que se ordenan en capas más o menos concéntricas, hasta llegar a los espermatozoides, los cuales están dispuestos en los niveles más altos cerca de la luz tubular.

Las células germinales masculinas maduras tienen que cumplir una serie de características para poder realizar su función; entre ellas, la de tener bien diferenciadas la cabeza, el cuello y la cola. Específicamente la cabeza es de vital importancia para la toxicología, pues su modificación morfológica disminuye la capacidad fertilizante de los espermatozoides y por tanto la calidad del semen (1). Su ocurrencia por encima de los valores normales compromete la supervivencia de la actual generación y las futuras.

Las células germinativas a pesar de estar protegida por una barrera hematotesticular, con frecuencia son afectadas por una variedad de agentes químicos que no solo interactúan con el ADN (1), sino que interfieren en el equilibrio existente entre supervivencia y apoptosis durante la espermatogénesis, generando en consecuencia no solo producciones reducidas de espermatozoides, (2) sino modificaciones tanto en las

características morfológicas de las células espermáticas, como de las células de Sertoli (3). Independientemente del tipo de daño provocado, estos deben ser detectados a la mayor brevedad posible y para lograrlo, los roedores son el biomodelo experimental utilizado para la obtención de evidencias toxicológicas reproductivas masculinas (4-7).

Desde ese punto de vista es comprensible plantear la necesidad de que las formulaciones vacunales en general y los adyuvantes en particular, no deben ser excluidos de los estudios toxicológicos reproductivos masculinos. En especial los componentes con potencialidades de ser incluidos en formulaciones vacunales parenterales y mucosales, como es el caso del adyuvante AFCo1 (8). Con ello se disminuye el riesgo, siempre presente, de ocurrencia de efectos autoinmunes en general y de infertilidad autoinmune en particular (9, 10) del producto terminado.

Referente al tema de evaluaciones experimentales empleando el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides, existe muy poca información disponible en Cuba. En este sentido se dispone solo de los resultados obtenidos por Betancourt (11), pero a partir del extracto fluido de una planta medicinal. Tal hecho, unido a que los cocleatos son productos a los cuales se les desconoce en muchos casos sus efectos tóxicos en mamíferos, son suficientes elementos para considerar esta investigación como una oportunidad para aportar nuevos conocimientos sobre su potencialidad toxicológica in vivo, específicamente sobre células germinativas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto citotóxico

y genotóxico en células espermáticas de ratón del adyuvante AFCo1.

## Materiales y Métodos

El diseño experimental se realizó fundamentalmente a partir de la información recopilada de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, específicamente las referentes a las evaluaciones genotoxicológicas (12). Mientras que el protocolo de estudio fue analizado y aprobado por la comisión institucional de ética para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### Sustancias a evaluar

Se utilizaron cuatro sustancias, a saber: las dos primeras constituidas por el adyuvante AFCo1 y su diluyente, procedente del Instituto Finlay (Centro de Investigación-Producción de Vacunas), conservadas a 4 °C en envases transparentes; las dos sustancias restantes fueron las de referencias: ciclofosfamida liofilizada como control positivo, producidas por Korea United Pharmaceutical Inc, conservada entre 20-25°C y, finalmente, agua destilada estéril como control negativo.

### Administración y dosificación

En todos los casos las administraciones se realizaron en las primeras horas del día, cinco veces seguidas con intervalo de 24 h, durante los primeros cinco días del experimento. En el caso específico del producto cocleato AFCo1, obtenido a partir del proteoliposoma de *N. meningitidis* serogrupo B y su diluyente, la dosis total ensayada por animal fue de 40 µL (1 mg/mL), por vía intranasal. A los animales pertenecientes al control positivo se les administró 40 mg/kg de peso corporal (mg/kg PC) de ciclofosfamida, y a los pertenecientes al control negativo, agua destilada estéril en una dosis de 1 mL/kg PC, por vía oral en ambos casos. Para ello se utilizó una cánula intragástrica No. 8 (Vygon, Francia).

### Animales de experimentación

Para el ensayo de citotoxicidad y de genotoxicidad en células espermáticas se seleccionaron ratones machos de la línea Cenp: NMRI, con edades entre 8-12 semanas y peso corporal entre 27-30 g al inicio de los experimentos, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), avalados con su correspondiente certificado de salud y calidad genética. Los animales utilizados se mantuvieron en observación siete días antes del experimento como periodo de adaptación en los locales pertenecientes al Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED).

Durante ese tiempo fueron registrados los datos del peso corporal, consumo de agua y de alimentos en días alternos, utilizando solo animales sanos, según lo establecen los

principios éticos de experimentación animal. Las salas de experimentación se mantuvieron con temperatura entre 22,0 ± 3,0 °C; humedad relativa de 30-70% y periodos de luz/oscuridad de 12/12 h. Culminado el periodo de adaptación se identificaron y distribuyeron al azar cinco ratones por jaulas, de suficiente tamaño para permitirles libertad de movimiento, las cuales contenían un lecho de viruta de madera no oleosa, cernida y esterilizada.

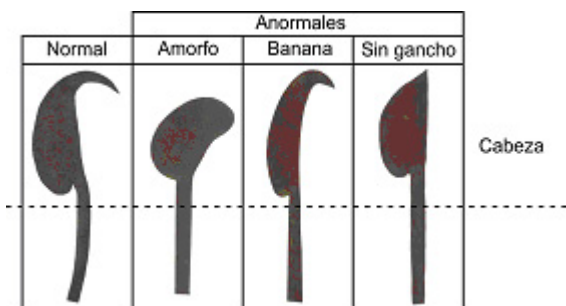
A cada jaula se le colocó una tarjeta con tinta permanente que contenía las siguientes informaciones: fecha de comienzo y terminación del estudio, número de animales por jaula, fecha de recibo, sexo, origen, especie, grupo de estudio, vías y fechas de administración. La alimentación consistió en una dieta a base de pienso concentrado multipropósito convencional CMO 1000, procedente del CENPALAB y agua fresca *ad libitum*, la cual se le retiró 16 h antes de cada administración.

### Ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide

Se conformaron cuatro grupos experimentales correspondientes a: AFCo1, diluyente, control positivo y control negativo, a los cuales se les registró el peso corporal durante los días 0, 6, 18 y 35 para detectar posibles variaciones, asociadas al tipo de sustancia y vía de administración, durante toda la etapa experimental.

Después de cada administración —según se especificó anteriormente— se realizaron observaciones clínicas a los animales dos veces al día, con el objetivo de detectar alguna manifestación de signos de toxicidad en las cuales se incluyeron: cambios en la piel, pelos (piloerección, alopecia), sistema respiratorio (disnea), digestivo (inapetencia, diarreas), sistema nervioso central (actividad motora, comportamiento social, temblores, convulsiones, salivaciones, letargo, sueño y coma). A los 35 días de iniciado el estudio y previo ayuno de 12 h, se practicó la eutanasia por dislocación cervical.

Inmediatamente después se obtuvo la suspensión espermática de cada testículo (1 mL). Para el conteo y registro de anomalías en la morfología espermática según clasificación de Wyrobeck y Bruce, 1975 (13), se tomó 0,5 mL de la suspensión espermática total obtenida, la cual se tiñó con una solución acuosa de eosina al 1%. Culminado el proceso de tinción, las láminas se dejaron reposar durante 15 min y se procedió a la observación microscópica (Figura 1), para de esta forma obtener la frecuencia de aparición de anomalías morfológicas (amorfo, banana o sin gancho) por cada 1000 espermatozoides contados. Los restantes 0,5 mL de la suspensión espermática se utilizaron para determinar la cantidad de espermatozoides con la ayuda de la cámara de Neubauer. En ambos casos las observaciones se realizaron en microscopios ópticos convencionales Olympus (modelo CH-2) y por un mismo observador.



**Figura 1.** Clasificación de los espermatozoides de ratón según su morfología.

## Estadística

Para la identificación de las variaciones estadísticamente significativas del peso corporal, en los cuatro grupos experimentales durante los días 0, 6, 12, 18 y 35 del estudio, se utilizó un ANOVA bifactorial (días, pesaje y grupo experimental) de medidas repetidas. Posteriormente, se realizó una comparación múltiple de los componentes principales, con corrección de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Mientras que para los restantes indicadores de toxicidad se utilizó la prueba de Games Howell ( $p < 0,05$ ). En todos los casos se empleó el programa estadístico SPSS 12.0.

## Resultados y Discusión

La evaluación toxicológica de los productos vacunales es una obligación científica y ética. Por lo que la búsqueda de evidencias sobre cualquier efecto adverso en general y reproductivo, en particular, es una preocupación constante de los productores (14, 15) y de los evaluadores de productos.

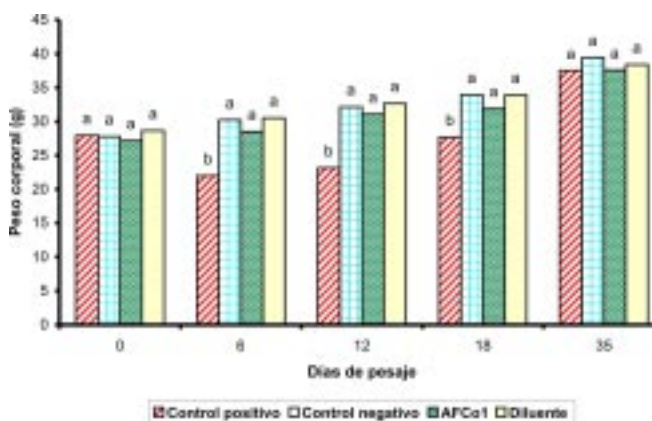
Concretamente en este estudio se pudo observar que en ninguno de los grupos experimentales relacionados con la administración del adyuvante AFCo1 y su diluyente tuvieron signos clínico-patológicos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Infante (16), cuando observó en roedores expuestos a igual producto, dosis y vía de administración, ausencia de secreciones nasales, disnea y lesiones anatomopatológicas macroscópicas. Por el contrario en el grupo tratado con ciclofosfamida (control positivo) se evidenció alopecia, inapetencia, disminución de la actividad motora y social. Lo que está en correspondencia con los efectos adversos típicos descritos y reportados para este producto (17).

Con los datos proporcionados por los pesajes durante los días 0, 6, 12, 18 y 35 del estudio se evaluó el efecto de las sustancias de la prueba y la vía de administración sobre la ganancia del peso corporal. En este caso se aprecia una clara tendencia general hacia el incremento significativo del peso corporal una vez culminado el experimento, con independencia de la sustancia ensayada. Específicamente se comprobó que la ganancia de peso corporal observada

tras la administración del AFCo1 o su diluyente, no difieren significativamente del control negativo (Figura 2). Lo que demuestra la ausencia de eventos adversos, reflejados en el peso corporal de los ratones.

Es importante señalar que este indicador de toxicidad general al sexto día del experimento en el grupo control positivo, exhibió una disminución de sus valores medios en relación con el peso inicial y con los grupos restantes. Esto parece guardar estrecha relación con la ciclofosfamida de referencia. Dicho compuesto provocó una marcada disminución del peso corporal que se mantuvo hasta el día 18 del experimento por debajo del peso inicial para ese grupo.

Este resultado confirma lo acertado que resultó la utilización de este compuesto con una dosis de 40 mg/kg de peso corporal, pues garantizó no solo la afectación temporal de su peso, sino que permitió la sobrevivencia, la posterior recuperación de los animales expuestos a ella y garantizó el daño genético en las células espermáticas.



**Figura 2.** Variaciones del peso corporal en ratones NMRI expuestos al AFCo1, su diluyente y los controles positivo y negativo durante el estudio toxicológico de fertilidad masculina. Letras diferentes difieren para la prueba de comparación múltiple de los componentes principales, con corrección de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Independientemente de la significación toxicológica que tienen los datos del pesaje, se debe considerar el análisis microscópico de los espermatozoides (densidad y morfología espermática) como el más importante en los estudios experimentales in vivo de toxicidad reproductiva masculina, pues a partir de su observación es posible formarse una idea bastante aproximada de los efectos que un agente puede inducir sobre las células espermáticas, es decir, de las potencialidades citotóxicas y genotóxicas de un agente.

En la Tabla 1 se exponen los valores medios y la variación porcentual de la densidad espermática, obtenidos tras la administración de los dos productos testados y los controles. Su análisis reveló que la administración del AFCo1 y su diluyente no reducen en forma significativa la densidad

**Tabla 1. Variaciones de la densidad espermática en ratones NMRI expuestos al AFCo1, su diluyente y controles positivo y negativo durante el estudio toxicológico de fertilidad masculina.**

Grupos experimentales	Dosis	Densidad espermática (10 <sup>6</sup> x mL) X ± DE	VD (%)
AFCo1	40 µL	55,0 <sup>a</sup> ± 2,68	136,13
Diluyente	40 µL	52,7 <sup>a</sup> ± 2,72	130,44
Control positivo	40 mg/kg	19,3 <sup>b</sup> ± 5,26	-47,77
Control negativo	1 mL/kg	40,4 <sup>a</sup> ± 2,13	--

Letras diferentes difieren para la prueba de Games Howell  $p < 0,05$ . DE= desviación estándar de la media (X), VD= variación de la densidad espermática.

espermática o, si se prefiere, no inducen citotoxicidad sobre los espermatozoides cuando se les compara con el control negativo.

Igualmente permitió identificar diferencias significativas entre el control positivo y los restantes grupos experimentales, en este caso la administración de ciclofosfamida afectó en un 47,77% la producción de gametos masculinos, lo cual significa un promedio de  $21,1 \times 10^6$  de espermatozoides menos en relación con el control negativo (1 mg/mL).

El análisis de la morfología de las células espermáticas es el punto culminante de estos estudios. Los resultados de la Tabla 2 muestran que el AFCo1 y su diluyente no indujeron variaciones negativas en la frecuencia de aparición de espermatozoides anormales (toxicidad genética); no existieron diferencias significativas cuando se les compara con los valores proporcionados por el grupo control negativo. Por el contrario, la ciclofosfamida aumentó como promedio 27,80 el número de espermatozoides anormales por cada 1000 contados consecutivamente, lo cual significa un incremento de un 534,61% con respecto al control negativo.

Los efectos favorables descritos posterior a la administración del producto cocleato AFCo1, no es un resultado aislado, todo lo contrario, están en plena correspondencia con otros estudios toxicológicos que han investigado la letalidad y tolerancia local causada por la administración de las vesículas purificadas de la membrana externa de dicho microorganismo. Sus resultados, al igual que el nuestro, confirman la ausencia tanto de afectaciones negativas en la ganancia de peso corporal, como de daños tisulares y celulares (18). Estas pruebas en su totalidad apoyan la hipótesis de que los componentes de la membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B no tienen relevancia desde el punto de vista toxicológico.

Los resultados aportan evidencias experimentales de que el AFCo1 no interfiere con alguna de las fases del ciclo celular testicular, ni daña su material cromosómico, por tanto se infiere

**Tabla 2. Variaciones de la frecuencia de aparición de anomalías espermáticas en ratones NMRI expuestos al AFCo1, su diluyente y controles positivo y negativo durante el estudio toxicológico de fertilidad masculina.**

Grupos experimentales	Frecuencia de aparición/1000 células X ± DE			
	Sin gancho	Banana	Amorfo	TA
AFCo1	2,2 <sup>a</sup> ± 0,44	2,4 <sup>a</sup> ± 0,54	4,8 <sup>a</sup> ± 0,83	3,13
Diluyente	1,6 <sup>a</sup> ± 0,54	2,6 <sup>a</sup> ± 0,54	4,8 <sup>a</sup> ± 1,09	3,00
Control positivo	14,4 <sup>b</sup> ± 2,3	47,0 <sup>b</sup> ± 3,71	22,0 <sup>b</sup> ± 3,53	27,80
Control negativo	4,0 <sup>a</sup> ± 1,0	4,2 <sup>a</sup> ± 0,44	7,4 <sup>a</sup> ± 1,51	5,20

Letras diferentes difieren para la prueba de Games Howell  $p < 0,05$ . DE= desviación estándar de la media (X). TA = frecuencia media total de espermatozoides anormales.

que su administración no debe afectar la producción de gametos masculinos, al menos en murinos. Esta situación satisfactoria genera condiciones propicias para que en un futuro próximo se inicien los estudios de teratogénesis correspondientes y con ello prever el efecto que el AFCo1 puede provocar en la formación de órganos y en el desarrollo embrionario. La exposición al AFCo1 no produce afectaciones citotóxicas ni genotóxicas en las células espermáticas en la vía nasal y las dosis evaluadas en ratón.

## Agradecimientos

Esta investigación se ha desarrollado gracias a la contribución del MSc. Alfredo Alfonso Castillo, Dr. MV. Pedro Alberto Suárez Arias, Dr. MV. Dany Larramendi Griñan, Lic. Deivys Portuondo Fuentes, Dra. MV. Petra Aguilera Feria y Téc. Narvis Sedeño Soularí, pertenecientes al Centro de Toxicología y Biomedicina.

## Referencias

1. Junqueira L, Carneiro J. Histología básica. 4ta. Edic. Madrid: Masson SA; 1996.
2. Tirado O, Martínez E, Rodríguez O, Danielsen M, Selva D, Reventós J, et al. Methoxyacetic acid disregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Biología Reproductiva* 2003; 68:1437-46.
3. Ichihara I, Pelliniemi LJ. Morphometric and ultrastructural analysis of stage-specific effects of Sertoli and spermatogenic cells seen after short-term testosterone treatment in young adult rat testes. *Annals of Anatomy* 2007;189(5):520-32.
4. Guzmán L, López R, Llerena G, Pino J, Retuerto F. Male germinal epithelium recovery in mice treated with only dose of Busulfan. *Revista Peruana de Biología* 2005;12(1): 205-10.
5. Obidike I, Maduabuchi I, Olumuyiwa S. Testicular morphology and cauda epididymal sperm reserves of male rats exposed to Nigerian Qua Iboe Brent crude oil. *Journal of Veterinary Sciences* 2007; 8(1):1-5.

6. Fernández G, Arena A, Fernández C, Mercadante A, Barbisan L, Kempinas W. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology* 2007; 23(1):106-12.
7. Wakui S, Takagi F, Muto T, Yokoo K, Hirono S, Kobayashi Y, et al. Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. *Toxicology* 2007; 238(2-3):186-91.
8. Del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gil D, Zayas C, et al. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants. *Vaccine* 2006; 24(S2): 250-1.
9. Bozhedomov V, Teodorovich O. Epidemiology and causes of autoimmune male infertility. *Urología*. 2005; (1):35-44.
10. Jones WR. Immunology of infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1981;8(3):611-39.
11. Betancourt BJ, Ramos RA, Bizoso PA, Decalo MM, Martínez MM, Edreira AA. Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1998;3(2):58-61.
12. European Medicines Agency. Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals. Step 5. En: Note for guidance on genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. UK: European Medicines Agency; 1998. [ICH Topic S 2 B, CPMP/ICH/174/95].
13. Wyrobeck A, Bruce W. Induction of sperm abnormalities in mice. *National Academy of Sciences* 1975; 72:4425.
14. Viscione KA, Branton SL, Vance AM, Gerard PD, Womack SK, Peebles ED. Effects of 6/85-strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccination alone at ten weeks of age or in conjunction with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation overlays at twenty-two or forty-five weeks of age on the reproductive and digestive organs of commercial egg-laying hens. *Poultry Science* 2009; 88(3):567-70.
15. Vance AM, Branton SL, Collier SD, Gerard PD, Peebles ED. Effects of time-specific F-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation overlays on prelay ts-11-strain *M. gallisepticum* vaccination on digestive and reproductive organ characteristics of commercial egg-laying hens. *Poultry Science* 2009; 88(5):980-3.
16. Infante FJ, 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;18(1):1-7.
17. Flórez J. Quimioterapia antineoplásica I. En: Flórez J. *Farmacología Humana*. Barcelona: Masson SA; 1997. p. 1019-23.
18. Núñez FJ, Herrera L, Infante FJ, González P, Pérez V, Argamasilla M, et al. Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local en una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2006; 15(2):18-21.

---

## Cytotoxic and genotoxic evaluation of the adjuvant AFCo1 by the sperm head morphology assay in NMRI mice

### Abstract

This study was developed to evaluate the cytogenotoxic potential on mice spermatogenic cells of the candidate adjuvant, AFCo1 (Adjuvant Finlay Cochleate 1 Adjuvant); obtained from the proteoliposome of *Neisseria meningitidis* serogroup B. The AFCo1 and its diluent were administered via intranasal in a 40  $\mu$ L dose (1 mg/mL), while the positive control (ciclofosfamida) and the negative one (sterile distilled water) were administered orally in 40 mg and 1 mL/kg, respectively. Rats (NMRI) were from 8 to 12 week of age with weighing from 27 to 30 g, and they were administered 5 doses with an interval of 24 hours during the first 5 days of the experiment. General toxicity (body weight), cytotoxicity of testicles (spermatogenic concentration) and genotoxicity (spermatogenic morphology) were evaluated. AFCo1 and its diluent provided neither general toxicity, cytotoxicity, nor genotoxicity. The cyclophosphamide produced cytotoxicity (47.77%) and genotoxicity (534.61%). It is concluded that AFCo1 and its diluent, could be considered non toxic for the spermatogenic cells with the dose level and the animal biomodel used.

**Keywords:** Spermatogenic cells, adjuvant, Cochleate, *Neisseria meningitidis* B, mice.

---

Recibido: Abril de 2009

Aceptado: Mayo de 2009