

Caracterización del peso corporal y de los parámetros hematológicos, hemoquímicos e histopatológicos del primate no humano *Chlorocebus aethiops sabaeus*, y demostración de su utilidad como modelo animal factible en el campo de la biomedicina

Jorge Castro, Pedro Puente, Rafael Martínez, Iris Valdés, Lázaro Gil, Gerardo Guillén, Yanelys Morera, Iraldo Bello, Karelia Cosme, Alexander Hernández, Leticia Martínez, Lizet Aldana, Dagmara Pichardo, Marta Ayala, Laura Iazo, Lisset Hermida, Edith Suzarte, Yaremis Romero

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB.
Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba
jorge.castro@cigb.edu.cu

RESUMEN

Se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del peso corporal y de los parámetros hematológicos, hemoquímicos e histopatológicos del primate no humano *Chlorocebus aethiops sabaeus*, (mono verde africano) y su utilidad como modelo animal factible en el campo de la biomedicina. El objetivo estuvo orientado a disponer de una especie de Primate no Humano (PNH), en su subespecie caribeña, cuya amplia disponibilidad y fácil manejo, lo convierten en un modelo animal atractivo en el campo de la biomedicina y de la industria farmacológica. Se describe, por primera vez, el rango fisiológico del peso corporal, las alteraciones histopatológicas y los principales parámetros hematológicos y hemoquímicos en diferentes grupos etarios y ambos sexos de PNH sanos de la especie *C. aethiops sabaeus* mantenidos en condiciones experimentales y se evaluó la capacidad de replicación del VDEN-2 y el comportamiento de los parámetros evaluados tras la administración de tres productos biotecnológicos para el tratamiento del cáncer. El impacto social y económico de esta investigación consiste en que permite obtener las características antropométricas de esta especie como referencia y material de consulta para futuras investigaciones. Este trabajo mereció el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba para el año 2018.

Keywords: *Chlorocebus aethiops sabaeus*, mono verde africano, modelo animal, peso corporal, hematología, hemoquímica, histopatología, virus dengue

ABSTRACT

Characterization of body weight and hematological, hemochemical and histopathological parameters for the non-human primate *Chlorocebus aethiops sabaeus* and its demonstration as feasible animal model in biomedicine. The body weight and the characterization of the hematological, hemochemical and histopathological parameters of the non-human primate *Chlorocebus aethiops sabaeus* (African green monkey) were characterized, together with its usefulness as animal model in biomedicine. The study was aimed for making available a NHP species on its Caribbean subspecies, easy to handle and of numerous Population which facilitates its use in biomedicine and for the biopharmaceutical industry. The physiologic range of body weight and the main hematological and hemochemical parameters were set for the different age groups and both sexes of healthy NHP *C. aethiops* subspecies kept under experimental conditions. Moreover, it was studied their capacity for the replication of Dengue virus serotype 2 and the performance of the analyzed parameters following the administration of three biotechnological products against cancer. The social and economic impact of this research are supported by the availability of the anthropometric characteristics for the species, as reference material for future research. This work received the Annual Award of the Cuban Academy of Sciences for the year 2018.

Palabras clave: *Chlorocebus aethiops sabaeus*, African green monkey, animal model, body weight, hematology, hemochemistry, histopathology, dengue virus

How to cite (Vancouver style):

Castro J, Puente P, Martínez R, Valdés I, Gil L, Guillén G, et al. Caracterización del peso corporal y de los parámetros hematológicos, hemoquímicos e histopatológicos del primate no humano *Chlorocebus aethiops sabaeus*, y demostración de su utilidad como modelo animal factible en el campo de la biomedicina. *Biotecnol Apl.* 2019;36(4):4501-12.

Introducción

El uso de Primates No Humanos (PNH) en las investigaciones biomédicas permite la obtención de grandes avances en la medicina y en la ciencia. Ello se debe a su cercanía filogenética al ser humano, lo que implica similitudes esqueléticas, de desarrollo, en la composición sanguínea, la dentición y los sistemas endocrino, nervioso y reproductor [1]. Estas especies constituyen en muchas ocasiones el único modelo animal

disponible para estudiar diversas enfermedades que afectan al hombre [2]. Tal es el caso de la confirmación final de la eficacia de las vacunas contra la viruela, prueba que se realiza mediante la exposición del primate al virus de la viruela [3].

Los macacos rhesus (*Macaca mulatta*) y macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), son las especies de PNH que más comúnmente se emplean en las

1. Vilensky JA. *Am J Physiol Anthropol.* 1988;75(2):283-4.

2. Fujiyama A, Watanabe H, Toyoda A, Taylor TD, Itoh T, Tsai SF, et al. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science.* 2002;295(5552):131-4.



investigaciones biomédicas [4]. No obstante, la reducción drástica de sus poblaciones propicia que se valore el uso de otras especies alternativas de PNH. En este sentido, una de las más promisorias y de mayor perspectivas, es el mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), que se considera una especie relevante para la realización de estudios biofarmacéuticos [5].

El mono verde africano pertenece a la familia Cercopithecidae y habita en la región del África subsahariana [6]. Esta especie tiene similitud genética, anatómica y fisiológica con los humanos, razón por la que se emplea en estudios neurológicos, inmunológicos y de diversas enfermedades infecciosas [7]. Entre las ventajas de su utilización con fines experimentales están sus bajos costos de mantenimiento, que pueden llegar hasta un 30 % con respecto a los valores de mantenimiento de un mono rhesus [8], y su mayor disponibilidad [4]. Además, el hecho de no transmitir el virus del herpes tipo B [9], así como la abundancia de la subespecie (*Chlorocebus aethiops sabaues*) en toda la zona del Caribe, provocan que el mono verde africano constituya una especie de PNH alternativa y promisoría en el desarrollo de las investigaciones biomédicas.

Por su parte, el peso corporal es un parámetro no específico, pero extremadamente confiable como indicador del bienestar y estado de salud de los animales [10], y su estudio se usa ampliamente por veterinarios e investigadores en el curso de las investigaciones biomédicas [11]. Variaciones significativas de sus valores pueden significar alteraciones en órganos y sistemas críticos de la fisiología animal, tales como el hígado y los riñones [12]. Los resultados de la medición y el seguimiento de este parámetro, son evaluados de manera sistemática como parte del análisis clínico de los PNH y constituyen un reflejo del estado de salud. Además, el peso corporal se utiliza para determinar los efectos de los cambios en las prácticas de manejo y para establecer rangos propios de evolución de este parámetro [13]. Por lo tanto, el peso corporal constituye un dato esencial para valorar en todos los estudios preclínicos, pero su medición debe estar asociada a la edad, el sexo y especie del animal [14].

A su vez, los parámetros hematológicos y hemocimicos se consideran herramientas útiles para evaluar el estado nutricional y la salud de los animales [15,16], así como para la comprensión de los posibles cambios producidos por agentes externos y enfermedades [17]. También son rutinariamente utilizados para diagnosticar y monitorear la progresión o reversión de enfermedades y efectos tóxicos, y permiten detectar la existencia de daños de manera rápida y con frecuencia antes de que aparezcan signos clínicos y lesiones microscópicas. Estas pruebas son más reveladoras que la mera observación de un animal y menos traumáticas que otras prácticas como la biopsia y la cirugía [18]. Asimismo son componentes claves en los estudios regulatorios de seguridad preclínica y tienen como objetivo apoyar el desarrollo y la comercialización de nuevos productos farmacéuticos [19]. Factores como la edad, el sexo, la dieta, las condiciones de mantenimiento, el estrés, el estado de gestación, entre otros, pueden afectar estos parámetros, por lo cual deben tenerse en cuenta en la evaluación de los mismos [20].

Diversos estudios documentan los rangos fisiológicos de los parámetros hematológicos y hemocimicos de algunas especies de PNH, la mayoría de las cuales pertenecen al género *Macaca*, en el cual se han llegado a caracterizar hasta 52 parámetros [21]. Sin embargo, a pesar de la relevancia del mono verde como modelo animal, son pocos los estudios de caracterización de estos parámetros. Además, los estudios existentes han empleado un número limitado de animales, o no han tenido en cuenta factores como el sexo y la edad [22, 23], lo cual dificulta la disponibilidad de valores de referencia para los parámetros de esta especie.

Otros elementos esenciales que deben conocerse durante los estudios preclínicos son las características histológicas de los animales, de forma tal que pueda conocerse previo al inicio del estudio, si las características de los órganos y tejidos se enmarcan dentro los rangos anatómico-fisiológicos y si existieran algunas alteraciones incidentales de la especie de PNH que se usa. Sin embargo, se publican pocos datos de los hallazgos incidentales en monos, pues no se comprende la importancia de publicar estos resultados que son lesiones espontáneas sin implicaciones toxicológicas [24], que permiten, por lo tanto, poder discernir entre el efecto provocado experimentalmente por un producto farmacológico o una infección y el estado normal del animal.

En la actualidad, los productos biotecnológicos tienen una gran importancia en la prevención, diagnóstico, control y tratamiento de enfermedades. Coincide que la investigación y el desarrollo de nuevos productos de este tipo, y específicamente los destinados al tratamiento de las enfermedades infecciosas y el cáncer, enfrentan la carencia o disponibilidad limitada de modelos animales adecuados. Tal situación reviste una gran importancia, al considerar que el cáncer es una de las afecciones de mayor incidencia a nivel mundial, con más de 17.5 millones de casos reportados en los últimos años, sólo superado por las enfermedades cardiovasculares [25]. En Cuba, el cáncer ocupa el segundo lugar entre las causas de mortalidad, con una prevalencia de los tipos de tumoración similar a la reportada a nivel mundial [26]. De igual modo, las enfermedades infecciosas también son una importante causa de muerte en el mundo, sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales [27]. Entre ellas, la Fiebre del Dengue y la Fiebre Hemorrágica del Dengue, constituyen problemas de salud que afectan a numerosos países. Se estima que más de dos billones de personas viven en áreas de riesgo y que ocurren anualmente 390 millones de infecciones causadas por los virus del dengue (VDEN), de las cuales 96 millones manifiestan sintomatología de intensidad variable [28].

Por lo tanto, disponer de una especie de PNH, tal como el mono verde africano en su subespecie caribeña, de amplia disponibilidad y fácil manejo, la convierte en un modelo animal atractivo, y constituye una prioridad en el campo de la biomedicina y de la industria farmacológica. En este sentido, para garantizar la solidez y confiabilidad de los resultados obtenidos en esta especie, resulta determinante el conocimiento de sus parámetros clínicos, hematológicos y hemocimicos, como datos de referencia antes, durante y después de cada estudio preclínico. Esto a pesar de

3. EMEA/CPMP/1100/02. Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox. 2002.
4. Ward KW, Coon DJ, Magiera D, Bhadresa S, Nisbett E, Lawrence MS. Exploration of the African green monkey as a preclinical pharmacokinetic model: intravenous pharmacokinetic parameters. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(4):715-20.
5. Arteaga ME, Ledón N, Casacó A, Pardo B, García M, Boleda M, et al. Systemic and skin toxicity in *Cercopithecus aethiops sabaues* monkeys treated during 26 weeks with a high intravenous dose of the anti-epidermal growth factor monoclonal antibody nimotuzumab. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(9):1390-5.
6. Coe CL, Savage A, Bromley LJ. Phylogenetic influences on hormone levels across the primate order. *Am J Primatol.* 1992;28:81-100.
7. Fainman J, Eid MD, Ervin FR, Palmour RM. A primate model for Alzheimer's disease: investigation of the apolipoprotein E profile of the vervet monkey of St. Kitts. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(6):818-9.
8. Despain KE, McDonough JH, McMonagle JD, McGinley MJ, Evans J. The toxicity of soman in the African green monkey (*Chlorocebus aethiops*). *Toxicol Mech Methods.* 2007;17(5):255-64.
9. Yalcin S, Mukai T, Kondo K, Ami Y, Okawa T, Kojima A, et al. Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 7):1673-7.
10. Kaliste E. The welfare of laboratory animals. Dordrecht: Springer; 2007.
11. Hickman DL, Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(2):155-9.
12. Bayne K, Turner PV. *Laboratory Animal Welfare.* San Diego: Elsevier; 2014.
13. Terranova CJ, Cofman BS. Body weight of wild and captive lemurs. *Zoo Biol.* 1997;16:17-30.
14. Ford SM, Davis LC. Systematics and body size: Implications for feeding adaptations in New World monkeys. *Am J Phys Anthropol.* 1992;88(4):415-68.
15. Mazet JK, Gardner IA, Jessup DA, Lowenstine LJ, Boyce WM. Evaluation of changes in hematologic and clinical biochemical values after exposure to petroleum products in mink (*Mustela vison*) as a model for assessment of sea otters (*Enhydra lutris*). *Am J Vet Res.* 2000;61(10):1197-203.
16. Trumble SJ, Castellini MA, Mau TL, Castellini JM. Dietary and seasonal influences on blood chemistry and hematology in captive harbor seals. *Mar Mamm Sci.* 2006;22:104-123.
17. Farah IO, Ngotho M, Kariuki T, Jeneby M, Irura L, Maina N, et al. Animal models of tropical human diseases. In: Hau J, van Hoosier G, editors. *Handbook of laboratory animal science.* 2nd edition. Volume III. New York: CRC Press; 2005. p. 169-224.
18. Whalan EJ. *A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals.* Dordrecht: Springer; 2015.

que existen algunos estudios que caracterizan al mono verde africano, pero con datos disponibles limitados.

Por tales razones, en este trabajo se determinó el rango fisiológico y se caracterizaron los principales parámetros clínicos, hematológicos y hemoquímicos para *Chlorocebus aethiops sabaues* en condiciones experimentales. Estos son elementos imprescindibles para los estudios en los que se evalúa el efecto de productos biotecnológicos destinados al tratamiento de afecciones del ser humano.

Estudio de los parámetros clínicos, hematológicos, hemoquímicos y caracterización histopatológica de PNH sanos de la especie *C. aethiops sabaues* en condiciones de cautiverio

En el trabajo se estudiaron las variaciones de peso corporal, los parámetros hematológicos y hemoquímicos de PNH de la especie *C. aethiops sabaues* mantenidos en condiciones de cautiverio.

El estudio del peso corporal y los parámetros hematológicos y hemoquímicos incluyó 400 PNH sanos de ambos sexos (200 hembras y 200 machos). Los animales se dividieron en cuatro grupos de 50 PNH de cada sexo y conformados por grupos de cuatro intervalos etarios (1-2, 3-4, 5-6 y 7-8 años). A cada animal se le determinó su peso corporal y se le realizaron determinaciones hematológicas y hemoquímicas.

Para el estudio histopatológico se utilizaron las muestras de tejidos obtenidos de 34 PNH adultos de ambos sexos (17 hembras y 17 machos), a los cuales una vez practicada la eutanasia y, una vez confirmada la muerte, se evaluó histopatológicamente a todos los órganos.

Durante el estudio, todos los PNH mostraron patrones conductuales y fisiológicos acordes con animales sanos. En el caso del peso corporal, se observaron valores superiores de este parámetro en los machos de todos los intervalos etarios ($p < 0.05$). Se detectó también el incremento del peso corporal con el aumento de la edad en ambos sexos, aunque en las hembras tal incremento solo se produjo hasta los 6 años ($p < 0.05$) (Figura 1).

Tras el análisis de los leucocitos totales no se encontraron diferencias entre ambos sexos en ninguno de los intervalos etarios estudiados (Figura 2A). Por otra parte, en el estudio de los linfocitos y los neutrófilos se observó diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras en los animales de 5-6 años ($p < 0.05$). En el caso de los neutrófilos, los valores más elevados estuvieron en los machos. Por el contrario, en los linfocitos, las hembras tuvieron niveles superiores de estas células (Figura 2B y 2C).

Los monocitos no presentaron diferencias significativas entre ambos sexos en ninguno de los intervalos etarios (Figura 2D).

Otros de los parámetros hematológicos analizados en el estudio fueron los componentes de la serie roja, donde siempre que hubo diferencias entre ambos sexos, y los machos presentaron los valores más elevados. En el caso de los eritrocitos totales, se detectaron diferencias estadísticas al comparar sus valores entre ambos sexos solo para el intervalo de 7-8 años de edad ($p < 0.05$; Figura 3A). Al analizar los valores de hemoglobina, se detectaron diferencias significativas

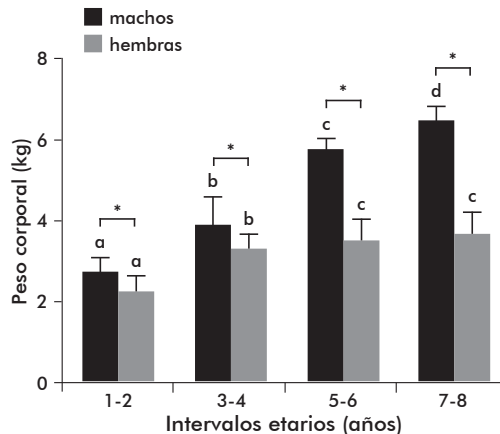


Figura 1. Peso corporal de los PNH sanos de la especie *Chlorocebus aethiops sabaues* mantenidos en condiciones de cautiverio. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando una prueba de Bonferroni. Letras diferentes representan las diferencias estadísticas entre los grupos de edad para el mismo sexo, ($p < 0.05$). *: Representa las diferencias estadísticas tras la comparación entre ambos sexos ($p < 0.05$; $n = 50$).

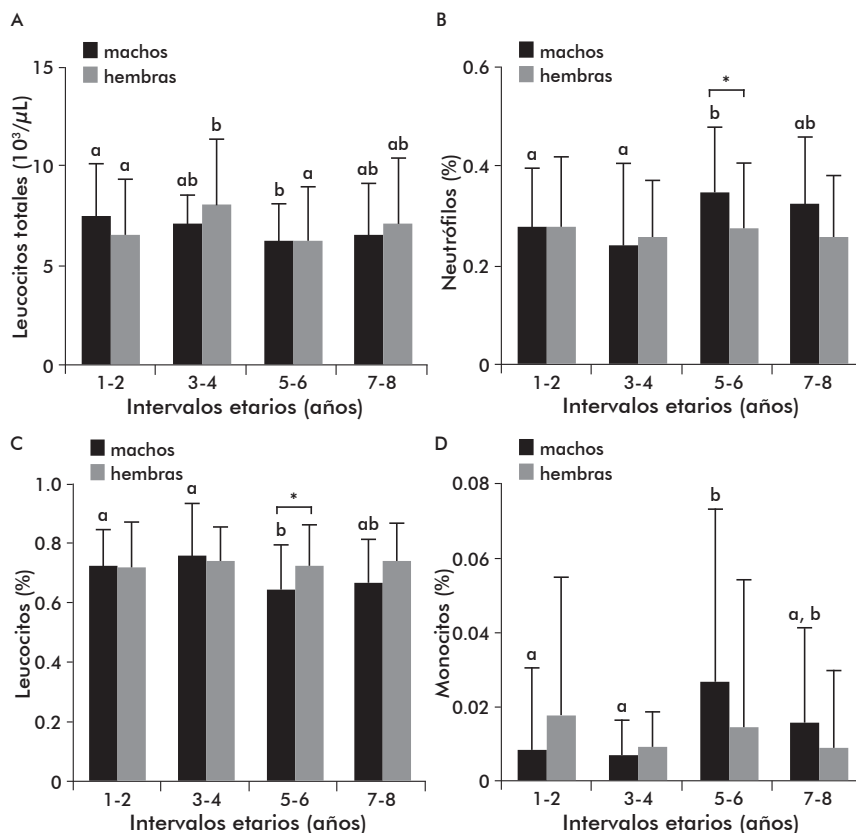


Figura 2. Comportamiento de los parámetros hematológicos de la serie blanca de los primates no humanos sanos de la especie *Chlorocebus aethiops sabaues* mantenidos en condiciones de cautiverio. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. A) Leucocitos Totales. B) Neutrófilos. C) Linfocitos. D) Monocitos. El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando una prueba de Bonferroni. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los intervalos etarios del mismo sexo. *: Representa las diferencias estadísticas tras la comparación entre ambos sexos ($p < 0.05$; $n = 50$).

($p < 0.05$) en los intervalos etarios 5-6 y 7-8 años (Figura 3B), mientras que en el caso del hematocrito las diferencias solo fueron detectables en el intervalo etario de 5-6 años ($p < 0.05$; Figura 3C).

En otros de los parámetros de la serie roja, el volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media, se detectaron diferencias en los intervalos etarios de 5-6 y 7-8 años ($p < 0.05$; Figura 3D y E), mientras que la concentración media de la hemoglobina corpuscular, tuvo valores similares en ambos sexos en todos los intervalos etarios (Figura 3F). Las plaquetas totales también presentaron diferencias estadísticas al comparar los valores entre ambos sexos en los intervalos etarios de 1-2 y 5-6 años ($p < 0.05$), sin embargo, en estos casos los valores más altos se observaron en las hembras (Figura 3G).

En la evaluación de los diferentes parámetros hemioquímicos, se observó que los valores de alanina amino transferasa fueron mayores los machos de 5-6 años de edad comparados con las hembras ($p < 0.05$; Figura 4A). En el caso de la aspartato amino transferasa, los machos tuvieron valores superiores a las hembras en el intervalo etario de 7-8 años ($p < 0.05$; Figura 4B). La comparación de los resultados de la fosfatasa alcalina permitió detectar valores superiores en las hembras de 1-2 y 7-8 años, comparados con los animales machos de igual edad ($p < 0.05$; Figura 4C). En los niveles de creatinina se observaron valores superiores de este parámetro en animales machos de 3-4, 5-6 y 7-8 años de edad ($p < 0.05$; Figura 4D).

Durante las mediciones de los niveles de las proteínas totales, glucosa y colesterol, se detectó que las hembras de 3-4 y 7-8 años presentaron valores superiores a los machos ($p < 0.05$; Figuras 4E, F e I). Valores igualmente superiores a los machos tuvieron los niveles de albúmina en los intervalos etarios de 3-4, 5-6 y 7-8 años ($p < 0.05$; Figura 4H). La comparación de los resultados de la bilirrubina total entre ambos sexos, permitió determinar valores superiores en los machos de 3-4 y 7-8 años de edad ($p < 0.05$) (Figura 4G).

Como resultado del estudio histopatológico se encontraron algunas anomalías en varios de los animales, que constituyen hallazgos a tener en cuenta en el empleo de estos animales en futuras investigaciones del campo de la biomedicina (Tabla 1).

Consideraciones sobre los parámetros analizados y sus variaciones

Los resultados muestran que el peso corporal varió significativamente con la edad y el sexo de los animales. Estudios previos documentan resultados similares a los obtenidos en este trabajo para ambos sexos [29, 30], incluso en animales con un origen genético y mantenidos con una dieta similar [23].

En el análisis de los parámetros hematológicos de PNH de la especie *C. aethiops sabaues*, en los resultados de los parámetros que conforman la serie blanca, no hubo diferencias en los Leucocitos totales entre sexos, resultados que si bien concuerdan con los de Casaco et al. [23], difieren de los descritos por Kagira et al. [31]. Estas diferencias que podrían explicarse por el número de animales empleados por estos autores, el origen genético de los PNH y las diferentes condiciones de ambientales, en el manejo y la alimentación a que ambas colonias estuvieron sometidas. En cuanto a los neutrófilos,

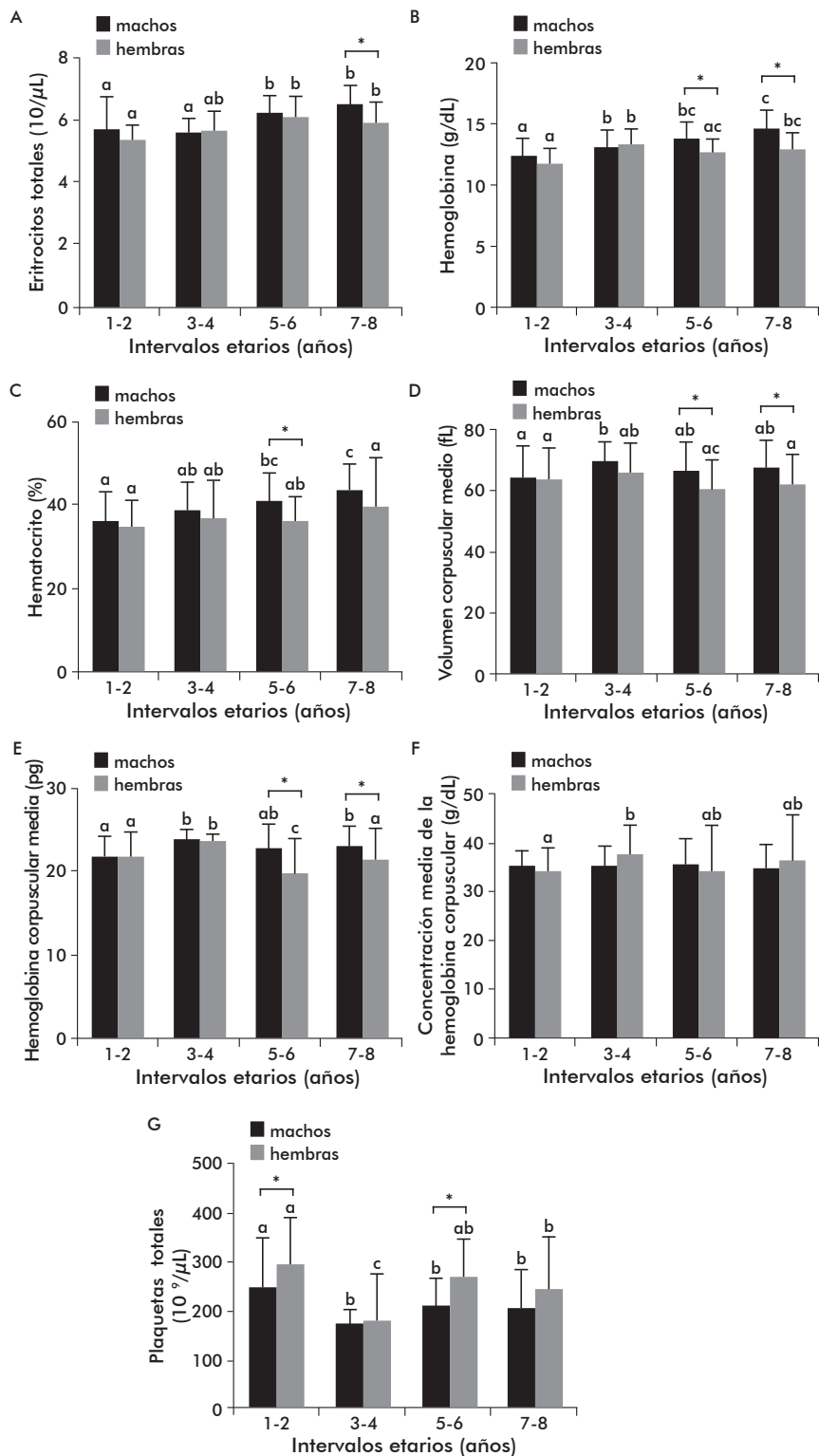


Figura 3. Comportamiento de los parámetros hematológicos de la serie roja de los primates no humanos sanos *Chlorocebus aethiops sabaues* en condiciones de cautiverio. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. A) Eritrocitos totales. B) Hemoglobina. C) Hematocrito. D) Volumen corpuscular medio. E) Hemoglobina corpuscular media. F) Concentración media de la hemoglobina corpuscular. G) Plaquetas totales. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble y una prueba de Bonferroni. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los intervalos etarios. *: Representa las diferencias estadísticas entre ambos sexos ($p < 0.05$; $n = 50$).

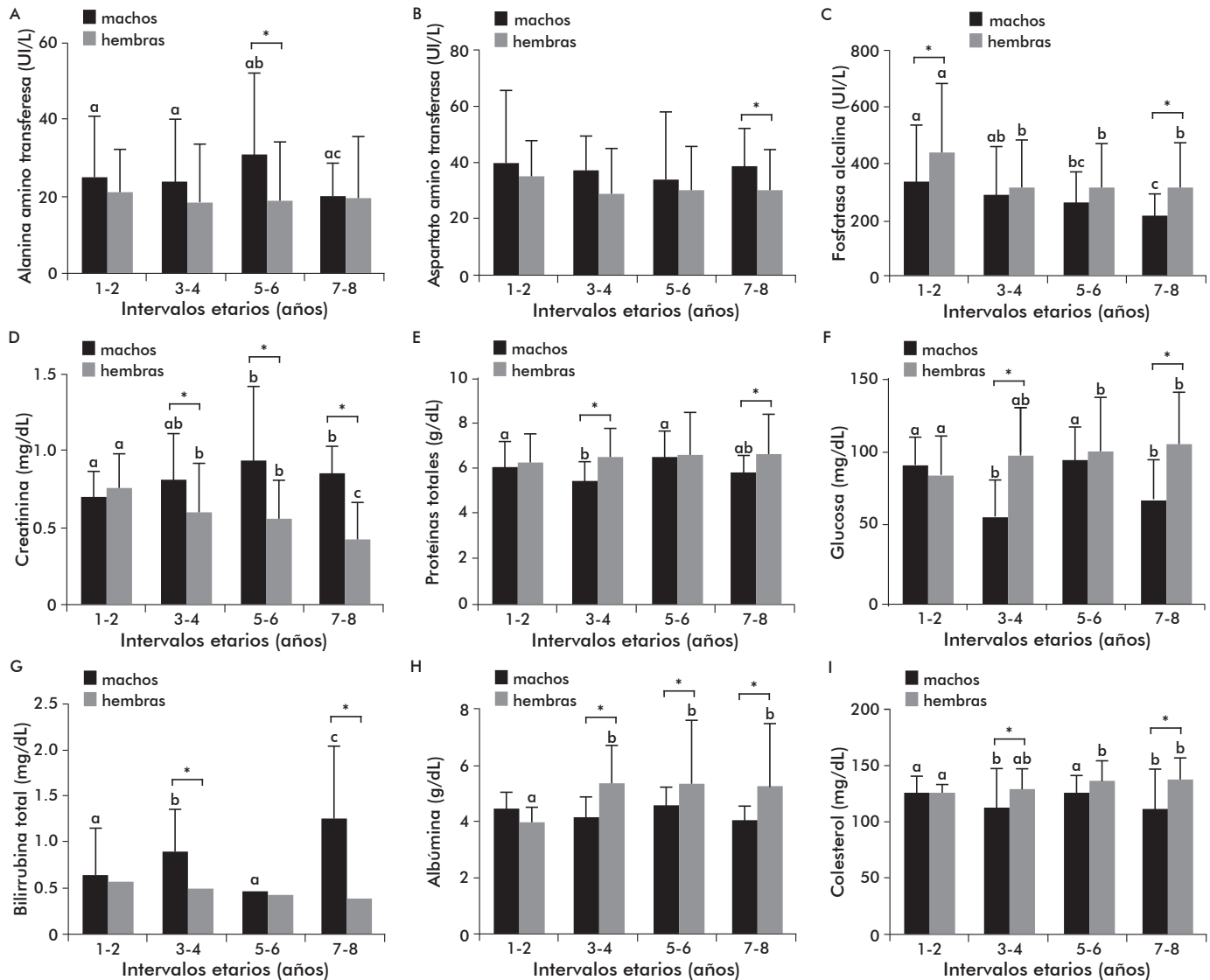


Figura 4. Comportamiento de los parámetros hemoquímicos en los primates no humanos sanos *Chlorocebus aethiops sabaesus* mantenidos en condiciones de cautiverio. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. A) Alanina amino transferasa. B) Aspartato amino transferasa. C) Fosfatasa alcalina. D) Creatinina. E) Proteínas totales. F) Glucosa. G) Bilirrubina total. H) Albúmina. I) Colesterol. El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando una prueba de Bonferroni. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los sexos de diferentes intervalos etarios. *: Representa las diferencias estadísticas tras la comparación entre ambos sexos ($p < 0.05$; $n = 50$).

los resultados del presente estudio muestran que en machos se produce un incremento en el número de células con la edad, como observó previamente Sato *et al.* [32]. Esto puede vincularse al papel de los estrógenos, hormonas que provocan la disminución del número de estas células en altas concentraciones [33].

En el análisis de los componentes de la serie roja, se encontraron valores altos en los eritrocitos totales, hemoglobina y hematocrito en los PNH machos de 5-6 y/o 7-8 años. En particular, altos valores de eritrocitos totales se reportaron previamente en otras especies de PNH [34]. Además, el volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media también tuvieron valores altos en los PNH machos a partir de los 5 años de edad. Tales diferencias en los valores de estos parámetros en los PNH hembras están

frecuentemente relacionadas con las pérdidas de sangre características del período menstrual. También se relacionan con el efecto de las hormonas masculinas y la mayor masa muscular de animales de este sexo, y tienen gran similitud con resultados obtenidos en monos verdes y otras especies de PNH [31, 32, 35]. Los mayores valores de las plaquetas totales se encontraron en las hembras, tal y como reportaron Kagira *et al.* [31], posiblemente debido a los requerimientos altos en la coagulación propios del ciclo menstrual.

En el análisis de los parámetros hemoquímicos de PNH de la especie *C. aethiops sabaesus*, los niveles de alanina amino transferasa y aspartato amino transferasa fueron inferiores a los descritos en animales de esta especie por otros autores [35]. Por el contrario, en los niveles de fosfatasa alcalina las diferencias

19. Weingand K, Brown G, Hall R, Davies D, Gossett K, Neptun D, et al. Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies. The Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing. *Fundam Appl Toxicol.* 1996;29(2):198-201.

20. Suleman MA, Wango E, Sapolsky RM, Odongo H, Hau J. Physiologic manifestations of stress from capture and restraint of free-ranging male African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *J Zoo Wildl Med.* 2004;35(1):20-4.

21. de Neef KJ, Nieuwenhuijsen K, Lambers AJ, Degen AJ, Verbon F. Blood variables in adult stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*) living in a captive group: annual variability. *J Med Primatol.* 1987;16(4):237-47.

observadas entre ambos sexos, concuerdan con lo observado por Liddie *et al.* [35], aunque difieren de lo reportado por Sato *et al.* [32] que utilizaron animales de la misma especie y similar origen. Las discrepancias podrían deberse a las diferencias en las condiciones ambientales, de mantenimiento y de dieta [35].

El incremento de la masa muscular asociado a la edad, justifica el aumento significativo de los niveles de creatinina observado en animales machos. Estos resultados coinciden con los datos aportados por otros investigadores en otras poblaciones de monos verdes africanos [35] y otras especies de PNH [36].

Estudios previos realizados en macacos *cynomolgus* encontraron en ambos sexos un aumento de los niveles de proteínas totales con el incremento de la edad [37]. En el presente estudio se observó un comportamiento similar solo en las hembras, divergencias que pudieran atribuirse a las diferencias entre especies, las condiciones en el manejo y la dieta. Los niveles sanguíneos de glucosa tienden también al incremento en la medida que aumenta la edad [38], lo que puede atribuirse a la existencia de niveles superiores de insulina [39] y a un metabolismo de la glucosa más acelerado en las edades tempranas de la vida [40]. Este planteamiento es consistente con resultados obtenidos en PNH de la especie *C. aethiops* [32] y en el presente trabajo, principalmente en hembras. Ello podría deberse al elevado estrés que sufren las hembras durante el proceso de sedación y extracción de sangre, que incrementa los niveles de cortisol [41] y glucosa en sangre.

Cuando se analizaron los niveles de bilirrubina total se observó que los mayores valores se detectaron en animales machos de mayor edad (7-8 años). Resultados informados por otros autores [32, 35] concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, por lo que podría sugerirse que los niveles de este parámetro no son influenciados por la dieta y las condiciones de manejo. Referente a la albúmina, estudios previos refieren un decrecimiento de los niveles de este parámetro con la edad en ambos sexos [42], disminución que puede deberse a las necesidades aumentadas de estas proteínas como transportadores y al acelerado catabolismo proteico propio de las edades tempranas [43]. Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los obtenidos por Sato *et al.* [32], donde en machos los valores más elevados de albúmina se obtuvieron en los animales más jóvenes. Por el contrario, en hembras los valores más bajos fueron detectados en el grupo de 1-2 años de edad, lo cual puede asociarse a las dietas diferentes que recibieron ambas colonias, factor de probada influencia sobre los parámetros hematológicos [44]. Los valores de colesterol detectados en este estudio resultaron similares a los reportados por Liddie *et al.* [35]. Sin embargo, los resultados fueron inferiores a los obtenidos por Sato *et al.* [32] y Hambleton *et al.* [45], hecho que podría estar causado por el origen genético y las condiciones de manejo diferente de dichas colonias.

En la evaluación del estado de salud de los animales mantenidos en condiciones de cautiverio, es importante conocer la histopatología de los mismos previo al comienzo de cualquier ensayo experimental. Esto se hace con el propósito de identificar posibles lesiones incidentales que pueden estar presentes durante el procedimiento o pueden aparecer durante el estudio, pero

Tabla 1. Resultados del estudio histopatológico de primates no humanos sanos *Chlorocebus aethiops sabaeus* en condiciones de cautiverio

Órganos	Anomalías	Edad (años)	Sexo	n
Cerebro	Calcificación focal	6	Machos	1
Riñón	Nefrocalcinosis	4	Hembras	1
Corazón	Pigmentos de lipofuscina	8	Hembras	1
Tiroides	Quistes	5	Machos	1
Higado	Eosinofilia, reacción de las células de Kupffer y neutrofilia	3, 6, 7	Hembras	3
	Hiperplasia de los conductos biliares	4	Machos	1
	Proliferación de tejido fibro-conectivo con hiperplasia de conductos biliares e infiltrado a células redondas en espacio porta	5	Machos	1
	Infiltrado de linfocitos en el espacio porta	6	Hembras	1
Vejiga	Hiperplasia y degeneración del epitelio/linfocitos en la submucosa	6	Machos	1
	Reacción inflamatoria en submucosa	8	Machos	1
Pulmones	Pigmentos negruzcos, escasos, en vasos y bronquios	3-8	Machos, Hembras	34
	Engrosamiento de las paredes alveolares, bronconeumonía y calcificación pulmonar, acompañada por una reacción inflamatoria crónica a células redondas y multinucleadas focalmente diseminada y congestión pulmonar	3-8	Machos, Hembras	34
Próstata	Proliferación de tejido fibro-conectivo en intersticio con hiperplasia e hipertrofia epitelial	8	Machos	1
Aorta	Calcificación de la capa media	7	Hembras	1
Ovarios	Quistes	6	Hembras	1
Glándulas adrenales	Congestión e hiperplasia	3	Hembras	1

que no son causa del mismo. En este estudio se identificaron varios cambios histológicos como la aparición de la lipofuscina, un pigmento insoluble que no resulta tóxico para la célula o sus funciones, lo cual se asocia a procesos de envejecimiento. Este pigmento se detectó en las fibras musculares del corazón, y la presencia de este pigmento también se ha reportado en otras especies de PNH [46,47] y en seres humanos [48].

Otro cambio histopatológico fue la calcificación en la capa media de la aorta en una hembra de ocho años. Tal calcificación puede responder al proceso de aterosclerosis típica de la edad y se ha reportado esporádicamente en muchas especies de PNH [49, 50]. Los monos verdes se consideran animales susceptibles al desarrollo de este tipo de lesión, por lo que constituyen actualmente un modelo animal de elección para el estudio de esta enfermedad [51].

Nuestros resultados mostraron además, en la mayoría de los animales ensayados la aparición de una pigmentación negruzca en los pulmones, denominada antracosis. La misma es provocada por un contaminante ubicuo del aire producto de la inhalación de polvo de carbón o la polución atmosférica propia de la vida urbana. Es un proceso benigno e inocuo que no produce dificultades respiratorias, ni predispone a otras formas de enfermedad [52]. Hallazgos similares se encontraron en macacos *irus* [53] y monos *rhesus* [54]. Por otro lado, la eosinofilia y neutrofilia hepática, así como el infiltrado linfocitario en el espacio porta y la reacción de las células de Kupffer encontrados en algunos de los animales, son hallazgos también previamente reportados en macacos *irus* [55]. Estos son parte de los elementos que frecuentemente pueden encontrarse en PNH, sin relación alguna con el efecto de alguna sustancia administrada y sin influencia visible en el estado de salud del animal. Además, la proliferación de tejido fibro-conectivo con hiperplasia de los conductos biliares e infiltrado a células redondas en el espacio porta y la hiperplasia de

22. Suleman MA, Wango E, Sapolsky RM, Odongo H, Hau J. Physiologic manifestations of stress from capture and restraint of free-ranging male African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *J Zoo Wildl Med.* 2004;35:20-4.

23. Casacó A, Beausoleil I, Gonzalez B, Luaces P, León A, Arteaga ME, et al. Hematological, biochemical, respiratory, cardiovascular and electrophysiological parameters in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaeus*). Its use in nonclinical toxicological studies. *J Med Primatol.* 2010;39:177-86.

24. Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2010;38:642-57.

25. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015. A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-48.

26. MINSAP. Anuario estadístico de Salud. La Habana: Minsap; 2016.

27. Vector-borne diseases. understanding the environmental, human health, and ecological connections, Workshop Summary Washington (DC). Washington: National Academies Press (US); Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats; 2008.

28. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-7.

29. Hiyaoka A, Yoshida T, Cho F, Goto N. Growth curves of body weight changes in laboratory-bred female African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Jikken Dobutsu.* 1989;38(3):239-44.

los conductos biliares, detectadas en dos animales, está descrita también en ratas, perros y PNH [56, 57]. Estos pueden asociarse con cambios inflamatorios sistémicos o locales, presentados en las vías biliares y/o en el tracto gastrointestinal, en ambos casos no asociados al efecto de un agente externo. Otros hallazgos como los quistes en los ovarios son comunes y se consideran prácticamente normales en hembras fértiles, los cuales se han documentado en macacos *rhesus* e *irus* [58, 59] y monos verdes [60]. De igual forma, la nefrocalcinosis no está asociada a la administración de una sustancia o la presencia de algún agente etiológico en los animales de laboratorio [55]. Estudios previos informan que esta es una de las lesiones frecuentemente observadas en las necropsias de PNH criados en zoológicos y ninguna posible causa está sugerida para su presencia [61].

La proliferación de tejido fibro-conectivo en intersticio con hiperplasia e hipertrofia de la próstata, podría ser un hallazgo propio de machos de edad avanzada y es un hallazgo frecuente en seres humanos [62].

El resto de los hallazgos histopatológicos detectados no han sido descritos con anterioridad en especies de PNH, y son considerados incidentales, sin relación con sustancias o productos sujetos a investigación.

Estudio del efecto de la infección con VDEN-2 en los parámetros clínicos, hematológicos y hemoquímicos de PNH de la especie *C. aethiops sabaeus*

Se estudió a cinco PNH machos sin inmunidad previa a dengue, divididos en dos grupos experimentales. El grupo I incluyó tres animales y el grupo II, dos animales. Los PNH del grupo I se inocularon con una dosis de 10^4 ufp de VDEN-2 infeccioso (cepa SB8553) por vía subcutánea en el día 0 del estudio. Posteriormente a los animales se les extrajo sangre durante 11 días para la evaluación de la viremia. Seguidamente, a los animales del grupo I se les administró una segunda dosis viral de 10^4 ufp a los 60 días de la primera inoculación. Al mismo tiempo los animales del grupo II se inocularon con igual dosis. A los animales de ambos grupos, se les realizaron extracciones de sangre diarias durante 11 días para la evaluación de la viremia.

En la evaluación de la capacidad de replicación del VDEN-2 en los PNH *C. aethiops sabaeus*, tras la infección primaria, se detectó viremia 24 h después de la inoculación viral en dos PNH del grupo I y en un PNH del grupo II. La viremia se detectó a partir del día tres en los animales restantes. En el grupo I la viremia tuvo una duración media de 4.67 días (Figura 5A). Tras la infección secundaria no se detectó viremia en ninguno de los animales del grupo I, mientras que los animales del grupo II, se observó una viremia con una duración media de 4.5 días (Figura 5B). Durante el estudio todos los PNH mostraron patrones conductuales acordes con animales sanos.

En el análisis de los órganos y sistemas que incluye la exploración clínica no se detectaron alteraciones del estado fisiológico de los animales. El peso corporal durante todo el estudio permaneció estable al igual que la temperatura corporal, parámetro que se mantuvo dentro del rango fisiológico de la especie (37-40 °C) en todos los animales.

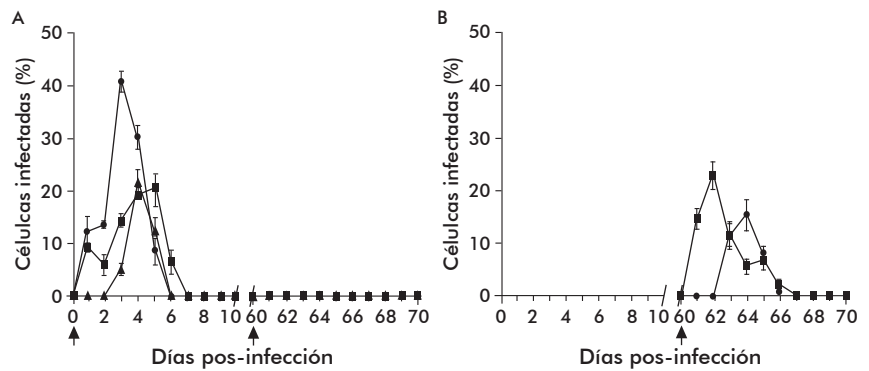


Figura 5. Viremia tras la infección primaria y secundaria con VDEN-2 (cepa SB8553) en monos verdes. A) Animales inoculados con 10^4 ufp de VDEN-2 (infección primaria) y retados al día 60 con 10^4 ufp de VDEN-2 (infección secundaria). B) Animales inoculados con 10^4 ufp de VDEN-2 (infección primaria) como control de replicación viral. Las flechas indican los tiempos de inoculación viral. Los sueros de los animales se colectaron durante 10 días y el virus se detectó por citometría de flujo a partir de las células infectadas con el suero de los animales. Se representa la media \pm error estándar de la media de dos determinaciones independientes.

De los parámetros hematológicos evaluados en el estudio tras la infección primaria con VDEN-2, solo se detectó un incremento significativo en los valores de concentración media de la hemoglobina corpuscular 30 días después de la inoculación viral (día 0) ($p < 0.05$). En el caso de los parámetros hemoquímicos, se detectaron incrementos en los niveles de la alanina amino transferasa, la aspartato amino transferasa y la fosfatasa alcalina ($p < 0.05$; Tabla 2).

30. Turner TR, Anapol F, Jolly CJ. Body weights of adult Vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) at four sites in Kenya. *Folia Primatol* (Basel). 1994;63(3):177-9.

31. Kagira JM, Ngotho M, Thuita JK, Maina NW, Hau J. Hematological changes in vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*) during eight months' adaptation to captivity. *Am J Primatol*. 2007;69(9):1053-63.

Tabla 2. Parámetros hematológicos y hemoquímicos de los primates no humanos de la especie *Chlorocebus aethiops sabaeus* tras la infección experimental con VDEN-2*

Parámetro	n	Infección	Día 0 (media \pm SD)	Día 30 (media \pm SD)	Significación estadística
Leucocitos totales	5	Primaria	8.12 \pm 0.81	7.82 \pm 4.61	-
	3	Secundaria	5.16 \pm 0.71	12.90 \pm 7.63	$p < 0.05$
Neutrófilos	5	Primaria	0.33 \pm 0.07	0.19 \pm 0.17	-
	3	Secundaria	0.32 \pm 0.06	0.25 \pm 0.11	-
Linfocitos	5	Primaria	0.66 \pm 0.06	0.79 \pm 0.16	-
	3	Secundaria	0.66 \pm 0.06	0.73 \pm 0.11	-
Monocitos	5	Primaria	0	0.01	-
	3	Secundaria	0.005	0.005	-
Eritrocitos totales	5	Primaria	6.35 \pm 0.87	6.62 \pm 0.37	-
	3	Secundaria	5.07 \pm 0.12	6.51 \pm 1.15	$p < 0.05$
Hemoglobina	5	Primaria	14.34 \pm 1.41	15.36 \pm 2.00	-
	3	Secundaria	13.56 \pm 1.05	15.21 \pm 2.37	-
Hematocrito	5	Primaria	41.60 \pm 5.07	45.2 \pm 8.28	-
	3	Secundaria	40.73 \pm 3.06	47.83 \pm 6.73	$p < 0.05$
Volumen corpuscular medio	5	Primaria	73.92 \pm 3.00	70.62 \pm 1.96	-
	3	Secundaria	72.65 \pm 1.59	74.38 \pm 4.43	-
Hemoglobina corpuscular media	5	Primaria	24.54 \pm 1.29	24.98 \pm 0.85	-
	3	Secundaria	24.53 \pm 0.62	23.61 \pm 0.59	-
Concentración media de la hemoglobina corpuscular	5	Primaria	33.24 \pm 2.42	37.9 \pm 4.31	$p < 0.05$
	3	Secundaria	33.78 \pm 0.49	33.33 \pm 1.35	-
Plaquetas totales	5	Primaria	185.00 \pm 36.42	220.20 \pm 73.41	-
	3	Secundaria	177.33 \pm 51.09	154.50 \pm 26.59	-
Alanina amino transferasa	5	Primaria	24.60 \pm 9.50	51.70 \pm 10.50	$p < 0.05$
	3	Secundaria	31.80 \pm 11.40	55.60 \pm 10.10	$p < 0.05$
Aspartato amino transferasa	5	Primaria	41.06 \pm 12.90	81.42 \pm 8.60	$p < 0.05$
	3	Secundaria	35.30 \pm 13.70	71.50 \pm 12.70	$p < 0.05$
Plaquetas totales	5	Primaria	0.50 \pm 0.20	0.67 \pm 0.20	-
	3	Secundaria	0.60 \pm 0.30	0.90 \pm 0.05	$p < 0.05$
Fosfatasa alcalina	5	Primaria	264.40 \pm 75.60	404.54 \pm 16.55	$p < 0.05$
	3	Secundaria	257.50 \pm 83.20	432.20 \pm 53.30	$p < 0.05$

* El análisis estadístico entre el día 0 y el día 30 se realizó mediante una prueba t pareada de comparación con corrección de Wilcoxon. Se muestran las diferencias estadísticas significativas entre el día 0 y el día 30 tras la infección experimental con VDEN-2 ($p < 0.05$).

Por otro lado, tras la infección secundaria con VDEN-2, se observó un incremento de los leucocitos totales, eritrocitos totales y del hematocrito, 30 días después de la segunda inoculación ($p < 0.05$). Además, también aumentaron los valores de las enzimas hepáticas alanina amino transferasa, la aspartato amino transferasa, la fosfatasa alcalina y la creatinina ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Estos resultados muestran que la administración de una dosis de VDEN-2 de 10^4 ufp, generó una viremia detectable, con un comportamiento similar al que se produce en humanos [63] y en otras especies de PNH [64].

En el estudio, se detectó la viremia 24 h después de la infección y tuvo una duración promedio de 4.5 días. Tales valores son similares a los obtenidos en monos rhesus infectados con una dosis similar de VDEN-1 donde la viremia fue de 4-5 días [65]. En monos verdes inoculados con igual dosis de VDEN-2, la viremia detectable tuvo un patrón similar al observado en dos de los animales del presente estudio, y provocó una viremia dos días de duración cuando se empleó una dosis superior de VDEN-2 (10^6 ufp) [66].

La infección viral no produjo signos clínicos evidentes en los animales y la temperatura y el peso de los animales se comportaron estables durante todo el estudio. Esto confirma las observaciones realizadas que muestran que los monos no reproducen las manifestaciones clínicas que la infección con dengue produce en los humanos. Otro estudio conducido por Onlamoon *et al.* [67] reveló la disminución transitoria de las plaquetas totales, los leucocitos totales, los neutrófilos, la hemoglobina y el hematocrito. Nosotros solo detectamos un incremento de la concentración media de hemoglobina corpuscular tras la primera inoculación viral, lo cual puede estar asociado a la disminución de la volemia que ocurre durante la infección con este patógeno. Además, la infección produce una neutropenia transitoria durante el período virémico que se recupera una vez eliminado el virus. No obstante, tal recuperación puede extenderse a más de 30 días en humanos, en dependencia del grado de la enfermedad y de factores propios del hospedero [68].

Resultó interesante además observar que la infección primaria provocó un incremento significativo de las enzimas alanina amino transferasa, aspartato amino transferasa y de fosfatasa alcalina, de forma similar a como está descrito en humanos con una hepatitis reactiva causada por la infección por VDEN [69].

Como se esperaba la infección homóloga secundaria no produjo en los animales una viremia detectable, ni signos típicos de enfermedad. Estudios epidemiológicos realizados en humanos sugieren que la infección por cualquiera de los serotipos del VDEN confiere inmunidad protectora de larga duración al serotipo infectante [70]. Otros autores también mencionan inmunidad protectora ante la reinfección con virus dengue en otras especies de PNH [71]. Sin embargo, la infección secundaria provocó un incremento de los niveles de leucocitos totales, eritrocitos totales y del hematocrito. Los incrementos de eritrocitos totales y el hematocrito puede asociarse a una fuga de líquido al espacio extracelular reportado en seres humanos [68]. Ello se produce por un bajo nivel de infección que afecta estos parámetros, pero que no es detectable por la técnica empleada para el aislamiento viral.

Tras la infección secundaria también se observó un incremento en las enzimas hepáticas, lo que sugirió la presencia de un proceso infeccioso. Si bien la infección por VDEN confiere protección al serotipo homólogo, tal inmunidad podría no ser esterilizante. El incremento de las enzimas hepáticas durante la infección secundaria, aun en ausencia de viremia detectable, podría explicarse por la presencia de una respuesta memoria de células T CD8+ citotóxicas que actúan para controlar la infección y, por lo tanto, causan la destrucción de los hepatocitos infectados.

Estudio del efecto de las formulaciones CIGB 128 y CIGB 128-A sobre los parámetros clínicos, hematológicos y hemoquímicos en PNH de la especie *C. aethiops sabaeus*

Se estudió a 7 PNH machos distribuidos en dos grupos (I y II), de cuatro y tres animales, respectivamente. El estudio constó de dos fases de 192 h cada una. En la primera fase, a los PNH del grupo I se les administró el CIGB 128 y a los del grupo II el CIGB 128-A (tiempo 0 de la primera fase). Seguidamente, tras un intervalo de dos semanas, tiempo que permitió el aclaramiento plasmático de las formulaciones y la desaparición de los eventos biológicos asociados a estas [72,73], se realizó la segunda fase. En ella se invirtieron las formulaciones administradas a cada grupo. Las formulaciones CIGB 128 y CIGB 128-A son desarrolladas en el CIGB para el tratamiento del cáncer, y se basan en la mezcla de iguales cantidades del IFN α 2b (3.5 MUI) e IFN γ (3.5 MUI) con diferentes componentes [74, 75].

Los parámetros hematológicos se evaluaron a las 0, 72 y 192 h de la administración de la formulación en cada fase, mientras que las evaluaciones hemoquímicas a las 192 h de cada fase. A lo largo del estudio todos los PNH mostraron patrones conductuales acordes con animales sanos. Además, en el análisis de los órganos y sistemas que se incluyen en la exploración clínica no se detectaron alteraciones del estado fisiológico en los animales. El peso corporal permaneció estable durante todo el ensayo y la temperatura corporal se mantuvo dentro del rango fisiológico de la especie (37-40 °C) en la mayoría de los animales.

En el análisis hematológico, tras la administración de ambas formulaciones, no se observó variaciones significativas en los parámetros que conforman la serie blanca (Tabla 3). En el análisis de la serie roja, se detectó que tras la administración del CIGB 128, los niveles de eritrocitos totales aumentaron a las 72 h con respecto al tiempo 0 h ($p < 0.05$), no obstante, ya a las 192 h se detectaron valores similares a los medidos al inicio del estudio. Por el contrario, para los animales que recibieron la formulación CIGB 128-A se observó una disminución a las 192 h de comenzado el estudio ($p < 0.05$) (Tabla 3). La hemoglobina mostró variaciones tras la administración de las formulaciones, tras la administración del CIGB 128 experimentó una disminución significativa a las 192 h con respecto al tiempo 0 y las 72 h ($p < 0.05$). No obstante, se observó un incremento en este parámetro a las 72 h con respecto a las 0 h ($p < 0.05$) tras la administración del CIGB 128-A, pero el mismo retornó al valor inicial una vez transcurridas 192 h de su administración (Tabla 3). En el caso del hematocrito la administración del CIGB

32. Sato A, Fairbanks LA, Lawson T, Lawson GW. Effects of age and sex on hematologic and serum biochemical values of vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2005;44(1):29-34.

33. Demyanets S, Wojta J. Sex differences in effects and use of anti-inflammatory drugs. In: Regitz-Zagrosek V (editor). *Sex and gender differences in pharmacology*. Handbook of Experimental Pharmacology. Dordrecht: Springer; 2012; p. 443-72.

34. Riviello MC, Wirz A: Haematology and blood chemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age. *J Med Primatol*. 2001;30(6):308-12.

35. Liddie S, Goody RJ, Valles R, Lawrence MS. Clinical chemistry and hematology values in a Caribbean population of African green monkeys. *J Med Primatol*. 2010;39(6):389-98.

36. Pierre PJ, Sequeira MK, Corcoran CA, Blevins MW, Gee M, Laudenslager ML, Bennett AJ. Hematological and serum biochemical indices in healthy bonnet macaques (*Macaca radiata*). *J Med Primatol*. 2011;40(5):287-93.

37. Xie L, Xu F, Liu S, Ji Y, Zhou Q, Wu Q, et al. Age- and sex-based hematological and biochemical parameters for *Macaca fascicularis*. *PLoS One*. 2013;8(6):648-92.

38. Khan SH, Masood U, Hanif MS, Bokhari SORS, Khan MJ. Effect of age and gender on blood lipids and glucose. *Rawal Med J*. 2012;37(4):344-7.

39. Smith CP, Williams AJK, Thomas JM, Archibald HR, Algar VD, Bottazzo GF, et al. The pattern of basal and stimulated insulin responses to intravenous glucose in first degree relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic children and unrelated adults aged. 5 to 50 years. *Diabetologia*. 1988;31(7):430-4.

40. Khan SH, Masood U, Hanif MS, Bokhari SORS, Khan MJ. Effect of age and gender on blood lipids and glucose. *Rawal Med J*. 2012;37:344-7.

41. Loeb WF. The nonhuman primate. In: *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. 1999. Loeb, Quimby (eds), 2nd ed. Philadelphia: Taylor and Francis; p. 145-62.

42. Veering BT, Burm AG, Souverein JH, Serree JM, Spierdijk J. The effect of age on serum concentrations of albumin and alpha 1-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 1990;29(2):201-6.

43. Ganong WF. *Circulating body fluids*. In: Foltin, Nogueira, Ransom & Sheinis (eds). *Review of Medical Physiology*. 20th ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2001. p. 499-527.

44. Izard MK, Heath SJ, Hayes Y, Simons EL. Hematology, serum chemistry values and rectal temperatures of adult greater galagos (*Galago garnettii* and *G. crassicaudatus*). *J Med Primatol*. 1991;20(3):117-21.

45. Hambleton P, Harris-Smith PW, Baskerville A, Bailey NE, Pavey KJ. Normal values for some whole blood and serum components of grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Lab Anim*. 1979;13(2):87-91.

46. Nakano M, Mizuno T, Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin in crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*): the same rate of lipofuscin accumulation in several species of primates. *Mech Ageing Dev*. 1993;66(3):243-8.

Tabla 3. Parámetros hematológicos y hemoquímicos en primates no humanos de la especie *Chlorocebus aethiops sabaeus* tras la administración de las formulaciones CIGB 128 y CIGB 128-A*

Parámetro	CIGB 128			CIGB 128-A		
	0 h (media ± SD)	72 h (media ± SD)	192 h (media ± SD)	0 h (media ± SD)	72 h (media ± SD)	192 h (media ± SD)
Leucocitos totales	4.530 ± 0.930	121.600 ± 0.820	4.710 ± 1.030	4.400 ± 0.990	5.060 ± 1.620	4.570 ± 0.640
Neutrófilos	0.300 ± 0.130	0.290 ± 0.160	0.320 ± 0.130	0.310 ± 0.100	0.240 ± 0.070	0.290 ± 0.090
Linfocitos	0.660 ± 0.120	0.690 ± 0.150	0.680 ± 0.130	0.660 ± 0.120	0.700 ± 0.090	0.680 ± 0.090
Monocitos	0.001 ± 0.003	0.001 ± 0.003	0.001 ± 0.003	0.002 ± 0.003	0.003 ± 0.004	0.001 ± 0.003
Eritrocitos totales	5.240 ± 0.220 a	5.700 ± 0.620 b	4.930 ± 0.660 a	5.500 ± 0.370 a	5.360 ± 0.440 ab	4.970 ± 0.330 b
Hemoglobina	14.400 ± 0.820 a	14.600 ± 1.400 a	12.500 ± 1.600 b	13.600 ± 0.940 a	14.900 ± 1.040 b	13.400 ± 1.040 a
Hematocrito	43.900 ± 4.500 a	44.400 ± 4.400 a	38.700 ± 4.700 b	42.400 ± 2.710 a	45.100 ± 2.800 b	41.800 ± 3.000 a
Plaquetas totales	277.500 ± 95.70	268.900 ± 109.5	286.600 ± 129.4	272.300 ± 121.6	239.900 ± 102.2	269.700 ± 41.21
Volumen corpuscular medio	77.600 ± 2.050	79.000 ± 2.030	78.000 ± 1.080	77.100 ± 1.590 a	81.000 ± 0.730 b	83.100 ± 2.120 c
Hemoglobina corpuscular media	26.000 ± 0.770 a	25.200 ± 0.650 b	25.900 ± 0.650 a	25.500 ± 0.670 a	26.300 ± 0.580 b	26.300 ± 0.710 b
Concentración media de hemoglobina corpuscular	33.300 ± 0.380 a	31.800 ± 0.490 b	33.100 ± 0.460 a	32.800 ± 0.440 a	32.500 ± 0.570 a	31.700 ± 0.340 b
Alanina amino transferasa	3.510 ± 1.370	ND	3.350 ± 1.250	2.390 ± 0.920	ND	2.100 ± 0.570
Aspartato amino transferasa	13.290 ± 1.740 a	ND	10.970 ± 2.560 b	14.990 ± 3.600	ND	15.140 ± 4.630
Creatinina	0.790 ± 0.220 a	ND	0.530 ± 0.170 b	1.060 ± 0.370 a	ND	0.670 ± 0.15 b

* El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando una prueba de Bonferroni (n = 7). Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre los tiempos para un mismo grupo experimental (p < 0.05). ND: parámetro no determinado.

128 provocó una disminución de sus valores 192 h después de su inoculación, mientras que para el CIGB 128-A los valores de este parámetro se incrementaron a las 72 h, y luego retornaron a los valores iniciales.

El volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media también experimentaron un aumento de sus niveles tras la administración del CIGB 128-A, mientras que la concentración media de la hemoglobina corpuscular se produjo una disminución al cabo de las 192 h de la inoculación. Tras la inoculación del CIGB 128, se detectó una disminución de los valores de la hemoglobina corpuscular media y de la concentración media de la hemoglobina corpuscular 72 h después de la administración. Los mismos retornaron a sus valores iniciales al cabo de las 192 h (Tabla 3).

El estudio de los parámetros hemoquímicos, permitió detectar la disminución de los valores de aspartato amino transferasa y creatinina posterior a la administración del CIGB 128. Para el CIGB 128-A, solo se observó disminución de la creatinina (Tabla 3).

Estudios clínicos realizados con el CIGB 128, refieren la ocurrencia de efectos secundarios tales como cefalea, anorexia, fiebre, leucopenia, anemia y elevación de las transaminasas [76]. En estudios clínicos con el CIGB 128-A se ha reportado la aparición de fiebre, anorexia, linfopenia y trombocitopenia [77, 78]. Sin embargo, los resultados del estudio demuestran que la administración del CIGB 128 o el CIGB 128-A no afectaron la conducta de los animales, ni se observaron afectaciones en los órganos y sistemas que comprenden la fisiología animal. En un estudio realizado en monos rhesus con dosis de 20 MUI/m² de IFN α , se observó un incremento de la ansiedad, disminución de la conducta exploratoria, depresión, lentitud de los movimientos y fatiga en los animales [79]. Tales discrepancias pueden deberse a la aplicación del IFN α de forma combinada con el IFN γ en nuestro trabajo, a la administración en especies diferentes de PNH, o a la dosis que recibieron los animales.

En seres humanos, la administración de IFN α 2 β provoca frecuentemente disminución del peso corporal [80]. Nosotros observamos que tras la aplicación del

CIGB 128 y el CIGB 128-A, todos los animales mantuvieron el peso corporal estable. Ello sugiere que ninguna de las dos formulaciones en las dosis ensayadas, causó afectaciones en este parámetro. Se conoce que la administración de IFNs de tipo α a seres humanos provoca aumentos de la temperatura corporal [81]. Por el contrario, en estudios realizados con IFN α en PNH de la especie *M. mulatta*, no se detectaron afectaciones de la temperatura corporal [82], aunque sí se ha observado hipertermia en estos animales tras la administración de IFN γ [83]. Tampoco se observaron incrementos de la temperatura, por lo que el comportamiento del parámetro es similar al observado en monos *rhesus*, especie tradicionalmente utilizada en estudios preclínicos.

En seres humanos, una de las reacciones más frecuentes, observadas tras la administración del IFN α 2 β , es la disminución de los leucocitos totales [84]. Por el contrario, en monos *rhesus* la administración de ese fármaco no tiene efectos sobre este parámetro [82], de forma similar a lo detectado en nuestro trabajo, sin que se presentaran afectaciones en los neutrófilos y los linfocitos.

De forma general, la ausencia de cambios en los valores de los componentes de la serie blanca, tras la administración de las dos formulaciones, sugiere que las mismas no producen efectos indeseados en estos parámetros. En el caso de la serie roja, sí se observó disminución de los valores de los eritrocitos totales tras la administración del CIGB 128-A y de la hemoglobina y el hematocrito tras el CIGB 128, lo que pudiera estar asociado al tratamiento con ambos productos. De hecho, la disminución de los niveles de eritrocitos totales, de la hemoglobina y del hematocrito se ha informado en seres humanos tras la administración del CIGB 128 [76].

Otros parámetros como las plaquetas totales, el volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y la concentración media de la hemoglobina corpuscular, no fueron influenciados por las formulaciones en estudio o solo variaron de forma transitoria. En este sentido, Rodríguez *et al.* detectaron trombocitopenia en seres humanos tras la administración de

47. Nakano M, Mizuno T, Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin in mammals: correlation between sexual maturation and the first appearance of lipofuscin. *Mech Ageing Dev.* 1990;52(1):93-106.

48. Nakano M, Oenzil F, Mizuno T, Gotoh S. Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology.* 1995;41(2):69-79.

49. Clarkson TB, Lehner ND, Wagner WD, St Clair RW, Bond MG, Bullock BC. A study of atherosclerosis regression in *Macaca mulatta*. I. Design of experiment and lesion induction. *Exp Mol Pathol.* 1979;30(3):360-85.

50. Trillo AA, Prichard RW. Early endothelial changes in experimental primate atherosclerosis. *Lab Invest.* 1979;41(4):294-302.

51. Clarkson TB. Nonhuman primate models of atherosclerosis. *Lab Anim Sci.* 1998;48(6):569-72.

52. Trigo FJ. Inmunopatología. In: Trigo Tavera FJ, Valero Elizondo G (editors). *Patología General Veterinaria*. 3era Edición. Ciudad de México: UNAM; 2014; p. 278.

53. Ito T, Chatani F, Sasaki S, Ando T, Miyajima H. Spontaneous lesions in cynomolgus monkeys used in toxicity studies. *Jikken Dobutsu.* 1992;41(4):455-69.

54. Andrade MC, Marchevsky RS. Histopathologic findings of pulmonary acariasis in a rhesus monkeys breeding unit *Rev Bras Parasitol Vet.* 2007;16(4):229-34.

55. Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control *Cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)* used in toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2010;38(4):642-57.

56. Greaves P. Digestive System. In: Greaves P. *Histopathology of preclinical toxicity studies*. Interpretation and relevance in Drug Safety Evaluation. Second Edition. New York: Elsevier Science; 2000. p. 456-9.

57. Zanzani SA, Gazzonis AL, Epis S, Manfredi MT. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol Res.* 2016;115(1):307-12.

IFN [85], hallazgos también considerados efectos adversos tanto del CIGB 128, como del CIGB 128-A en seres humanos [86, 87].

Finalmente, en el estudio hemoquímico de los animales tratados con ambas formulaciones, solo se detectó una disminución de los niveles de la aspartato amino transferasa luego de la administración del CIGB 128. Esta enzima es considerada como marcador de daño hepático [88], y su disminución no tiene significado clínico alguno. Por lo tanto, puede considerarse que ambas formulaciones no provocan alteraciones hepáticas en los animales, aún y cuando existen reportes de incrementos de las transaminasas tras de la administración de IFN en seres humanos [76].

Los valores de creatinina disminuyeron, pero con niveles de esta sustancia dentro del rango fisiológico determinado en este trabajo para esta especie de PNH, y sin presencia visible de patologías renales o de otro tipo en los animales. Por ello, carece de significado clínico y no implica un daño al organismo del animal [89]. Tampoco existen datos sobre afectaciones de estas sustancias o de productos similares a este nivel. No obstante, los niveles de creatinina disminuyeron tras la administración de las dos formulaciones en estudio, por lo que pudiera ser un hallazgo de este trabajo, lo cual se ha descrito previamente.

Estudio del efecto del CIGB 247 sobre los parámetros clínicos, hematológicos y hemoquímicos en PNH de la especie *C. aethiops sabaeus*

En este estudio se utilizaron 12 PNH machos distribuidos en cuatro grupos experimentales de tres animales cada uno (I-IV). Los grupos I, II y III se inmunizaron con la formulación del CIGB 247 en diferentes dosis (100, 200 y 400 µg, respectivamente), combinado cada dosis con 200 µg de VSSP, en un volumen de 0,5 mL. Las formulaciones se administraron por vía subcutánea con una frecuencia semanal durante 8 semanas. El grupo IV (grupo control negativo), no recibió ninguna formulación. El CIGB 247 es un preparado vacunal dedicado al tratamiento del cáncer desarrollado en el CIGB, basado en un antígeno recombinante representativo de la isoforma 121 del VEGF-A humano obtenido a partir de la bacteria *Escherichia coli*, combinado con el adyuvante de origen bacteriano VSSP, derivado de las vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Los parámetros hematológicos y hemoquímicos se evaluaron en el tiempo 0 y en las semanas 4 y 8 del estudio.

Durante el estudio todos los PNH mostraron patrones conductuales acordes con animales sanos. De igual modo, los órganos y sistemas que conformaron la exploración clínica no presentaron alteraciones con respecto al estado fisiológico normales de estos animales. Asimismo el peso corporal permaneció estable durante todo el estudio y la temperatura corporal se mantuvo dentro del rango fisiológico de la especie (37-40 °C) en la totalidad de los animales.

Como resultado en los parámetros que conforman la serie blanca se observaron incrementos en los niveles de los leucocitos totales en el grupo I (100 µg), de los linfocitos en los grupos I y III (100 y 400 µg, respectivamente) ($p < 0.05$). Por el contrario, se observó disminución en los neutrófilos en el grupo I

(100 µg; $p < 0.05$) y de los monocitos en los grupos II y III (200 y 400 µg, respectivamente) ($p < 0.05$; Tabla 4). Al analizar los parámetros que conforman la serie roja, se observaron variaciones en los eritrocitos totales en el grupo I (100 µg) y de hematocrito y plaquetas totales, en el grupo II (200 µg; $p < 0.05$). También se detectaron variaciones ($p < 0.05$) del volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media en los grupos tratados (I, II y III), donde principalmente se observaron disminuciones en los niveles de estos parámetros en la semana 4 ($p < 0.05$), los cuales retornaron a los valores iniciales en la semana 8 (Tabla 4).

En estas determinaciones de los parámetros hemoquímicos (Tabla 4) solo se encontraron variaciones en

58. Marr-Belvin KA, Bailey CC, Heather L, Knight LH, Klumpp AS, Westmoreland VS, Miller DA. Ovarian pathology in rhesus macaques: A 12-year retrospective. *J Med Primatol.* 2010;39(3):170-6.

59. Cline JM, Wood CE, Vidal JD, Tarara RP, Buse E, Weinbauer GF, et al. Selected background findings and interpretation of common lesions in the female reproductive system in macaques. *Toxicol Pathol.* 2008;36(7):142-63.

60. Kim SW, Lee YH, Lee SR, Kim KM, Lee YJ, Jung KJ, et al. Bilateral ovarian cysts originating from rete ovarii in an African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *J Vet Med Sci.* 2012;74(9):1229-32.

Tabla 4. Resultados del estudio histopatológico de primates no humanos sanos *Chlorocebus aethiops sabaeus* en condiciones de cautiverio

Parámetro	Grupos	Día 0	Semana 4	Semana 8
Leucocitos totales	I	6.37 ± 2.76 a	5.15 ± 0.80 ab	7.60 ± 1.94 b
	II	4.33 ± 0.50	4.27 ± 1.95	5.43 ± 0.51
	III	4.30 ± 1.11	6.57 ± 2.75	4.97 ± 0.42
	IV	6.40 ± 1.47	6.00 ± 2.44	7.20 ± 0.46
Neutrófilos	I	0.36 ± 0.14 a	0.19 ± 0.17 ab	0.19 ± 0.08 b
	II	0.31 ± 0.19	0.20 ± 0.04	0.29 ± 0.09
	III	0.46 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.30 ± 0.10
	IV	0.30 ± 0.12	0.20 ± 0.10	0.16 ± 0.11
Linfocitos	I	0.61 ± 0.15 a	0.80 ± 0.16 b	0.80 ± 0.08 b
	II	0.59 ± 0.13	0.80 ± 0.04	0.71 ± 0.09
	III	0.48 ± 0.04 a	0.73 ± 0.09 b	0.70 ± 0.11 b
	IV	0.38 ± 0.34	0.49 ± 0.43	0.58 ± 0.51
Monocitos	I	0.03 ± 0.06	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01
	II	0.16 ± 0.04 a	0 ± 0 b	0.01 ± 0.01 b
	III	0.12 ± 0.03 a	0 ± 0 b	0.01 ± 0.01 b
	IV	0.02 ± 0.04	0 ± 0	0 ± 0
Eritrocitos totales	I	5.63 ± 0.38 a	6.67 ± 0.32 b*	6.21 ± 0.51 ab
	II	5.55 ± 0.41	5.95 ± 1.39b	5.89 ± 0.87
	III	5.97 ± 1.06	6.12 ± 1.42b	6.12 ± 0.47
	IV	5.10 ± 0.55	5.06 ± 0.37 *	4.97 ± 0.31
Hemoglobina	I	13.25 ± 1.37	15.10 ± 1.99	14.40 ± 2.39
	II	13.60 ± 1.44	13.63 ± 1.06	12.63 ± 1.96
	III	15.10 ± 3.38	13.33 ± 1.53	13.03 ± 2.06
	IV	12.17 ± 1.27	11.97 ± 0.47	11.50 ± 0.44
Hematocrito	I	36.67 ± 3.32	42.62 ± 5.60	42.97 ± 4.07
	II	41.33 ± 4.93 a	31.20 ± 7.67 b	40.57 ± 6.24 a
	III	41.67 ± 4.73	36.07 ± 5.13	41.90 ± 8.25
	IV	25.68 ± 22.04	23.95 ± 20.64	23.64 ± 20.20
Volumen corpuscular medio	I	74.52 ± 1.32 a	64.77 ± 9.14 b	66.60 ± 7.02 ab
	II	73.20 ± 3.38 a	52.67 ± 0.35 b	68.83 ± 0.45 a
	III	73.67 ± 3.78 a	54.20 ± 0.98 b	71.59 ± 4.01 a
	IV	65.43 ± 12.22	65.37 ± 11.83	68.93 ± 3.86
Hemoglobina corpuscular media	I	24.32 ± 0.71 a	22.14 ± 3.54 b*	23.00 ± 2.30 ab
	II	24.43 ± 0.76 a	19.37 ± 1.07 b*	21.43 ± 0.21 ab
	III	24.60 ± 0.85 a	21.10 ± 2.39 b	21.87 ± 1.03 ab
	IV	23.83 ± 0.42	23.03 ± 2.73 *	23.23 ± 1.87
Concentración media de la hemoglobina corpuscular	I	34.63 ± 3.54	34.58 ± 1.94	34.77 ± 2.59
	II	32.70 ± 1.76	36.00 ± 2.59	31.13 ± 0.35
	III	33.93 ± 0.83	35.20 ± 1.22	30.50 ± 1.04
	IV	37.37 ± 7.24	35.20 ± 2.40	33.67 ± 1.60
Plaquetas totales	I	195.50 ± 29.39	183.50 ± 31.67	229.50 ± 41.57
	II	243.67 ± 53.20 a	151.67 ± 94.08 b	209.67 ± 30.11 ab
	III	191.33 ± 39.31	171.00 ± 31.80	215.67 ± 30.62
	IV	233.33 ± 108.49	264.33 ± 98.82	247.67 ± 69.04
Alanina amino transferasa	I	21.78 ± 5.87	18.67 ± 2.02	22.47 ± 13.97
	II	16.53 ± 2.21	13.81 ± 3.21	15.56 ± 9.92
	III	27.81 ± 9.04	15.36 ± 3.97	16.72 ± 8.76
	IV	23.82 ± 10.65	15.36 ± 4.46	15.31 ± 5.93

* El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando una prueba de Bonferroni. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre los tiempos para un mismo grupo experimental ($p < 0.05$). *: Representa las diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales en un mismo tiempo de estudio ($p < 0.05$; $n = 3$).

el grupo I, donde se observó disminución de los niveles de aspartato amino transferasa y de glucosa en la semana 4. Ya en la semana 8, los valores retornaron a los niveles iniciales.

Eventos hemorrágicos tales como epistaxis, hematemesis, sangrado gastrointestinal y vaginal y hemorragia cerebral, así como también trastornos neurológicos como el síndrome de leucoencefalopatía reversible, se han descrito tras la administración de medicamentos inhibidores del VEGF [90]. Otros efectos adversos como hipertensión, infecciones del tracto respiratorio alto, anorexia, estomatitis, diarreas, dolor de cabeza, disnea, fatiga y dermatitis exfoliativa, también se han informado tras la administración de medicamentos anti-VEGF [91]. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de los pacientes tratados con el CIGB 247 en estudios clínicos habían presentado alguna de estas síntomas [92], así como tampoco se observaron en monos *cynomolgus* tratados con otra vacuna anti-VEGF [93] y en los animales utilizados en este trabajo. Esos resultados aportan evidencias relacionadas con el índice de seguridad del CIGB 247 y también de la efectividad de los PNH de la especie *C. aethiops sabaeus* como modelo animal relevante para el estudio toxicológico.

En un primer estudio clínico, la administración del CIGB 247 en dosis de 100 µg solo produjo episodios de fiebre en dos de los voluntarios [92]. En monos *cynomolgus* otra vacuna anti-VEGF provocó el incremento de la temperatura en las primeras 24 horas post-administración [93], hallazgo no detectado en ninguno de los animales utilizados en nuestro trabajo.

La neutropenia es una de las alteraciones reportadas después del tratamiento con otros medicamentos inhibidores del VEGF en seres humanos [90]. En monos *cynomolgus* la administración de una vacuna anti-VEGF provocó leucocitosis y neutrofilia [93]. En el presente estudio solo se produjo una disminución de los neutrófilos, acompañada de un incremento de los leucocitos totales y los linfocitos en el grupo de 100 µg (grupo I). En el caso de los monocitos, la disminución de los niveles de estas células en las semanas cuatro y ocho de tratamiento en los grupos experimentales de mayor dosificación (II y III, 200 y 400 µg, respectivamente) reveló un posible vínculo con la acción del CIGB 247. Los niveles del hematocrito disminuyeron en la semana 4 en el grupo II (200 µg), y el volumen corpuscular medio y la hemoglobina corpuscular media en todos los grupos que recibieron el CIGB 247 también en la semana 4. En la semana 8 se incrementaron sus niveles, que retornó a los valores iniciales, lo cual indicó que cualquier posible alteración es de tipo transitoria, y los valores retornan a sus niveles anteriores de manera espontánea.

En el caso de los parámetros hemoquímicos, de manera general, su comportamiento fue estable, pues solo dos de estos parámetros variaron para una de las dosis ensayadas. No obstante, la recuperación de estos valores fue completada para la última semana de administración del candidato, por lo que puede considerarse transitoria y reversible [92]. No obstante, en otros estudios se ha visto que es común la aparición de proteinuria posterior a la inhibición del VEGF [94], lo que pudiera provocar la disminución de las proteínas sanguíneas e incluso producir la elevación de los

Tabla 4 (continuación). Resultados del estudio histopatológico de primates no humanos sanos *Chlorocebus aethiops sabaeus* en condiciones de cautiverio

Parámetro	Grupos	Día 0	Semana 4	Semana 8
Aspartato amino transferasa	I	49.00 ± 10.12 a	26.42 ± 4.98 b	28.39 ± 8.93 ab
	II	37.53 ± 9.78	20.42 ± 6.15	22.56 ± 5.29
	III	40.28 ± 5.29	34.42 ± 9.92	21.08 ± 10.09
	IV	32.20 ± 12.34	20.39 ± 4.74	28.97 ± 15.87
Fosfatasa alcalina	I	296.27 ± 238.03	396.73 ± 350.85	247.87 ± 118.85
	II	345.77 ± 386.65	174.90 ± 17.08	277.57 ± 139.79
	III	420.93 ± 325.62	191.40 ± 32.50	350.53 ± 277.42
	IV	274.63 ± 194.79	269.54 ± 75.96	343.93 ± 249.25
Bilirrubina total	I	0.62 ± 0.05	0.38 ± 0.08	0.24 ± 0.02
	II	0.53 ± 0.07	0.39 ± 0.02	0.88 ± 1.05
	III	0.70 ± 0.09 a	0.49 ± 0.10 ab	0.23 ± 0.02 b
	IV	1.45 ± 1.73	0.17 ± 0.18	1.11 ± 1.02
Creatinina	I	0.80 ± 0.23	0.71 ± 0.12	0.63 ± 0.32
	II	0.77 ± 0.25	0.84 ± 0.09	0.46 ± 0.09
	III	0.93 ± 0.15	0.86 ± 0.07	0.41 ± 0.18
	IV	0.84 ± 0.17	1.11 ± 0.53	1.29 ± 0.83
Proteínas totales	I	6.40 ± 0.31	6.26 ± 0.31	5.88 ± 0.75
	II	6.35 ± 0.32	5.92 ± 0.18	4.98 ± 0.88
	III	6.42 ± 0.20 a	6.03 ± 0.36 ab	4.95 ± 0.35 b
	IV	5.22 ± 1.90	5.34 ± 0.76	5.23 ± 0.44
Albúmina	I	4.14 ± 0.20	3.88 ± 0.21	3.64 ± 0.22
	II	4.20 ± 0.19	3.93 ± 0.07	3.68 ± 0.29
	III	4.36 ± 0.27	3.96 ± 0.17	3.90 ± 0.54
	IV	3.98 ± 0.59	3.80 ± 0.18	3.82 ± 0.53
Glucosa	I	91.41 ± 6.68 a	69.02 ± 8.78 b	84.78 ± 1.25 a
	II	92.66 ± 5.99	80.13 ± 11.17	83.79 ± 0.33
	III	80.05 ± 4.62	71.42 ± 6.32	83.87 ± 0.73
	IV	79.74 ± 16.40	79.29 ± 26.08	78.94 ± 13.45

niveles de transaminasas y en algunos casos, hepatotoxicidad [95].

Conclusiones

La disponibilidad de parámetros de referencia de peso corporal, hematológicos, hemoquímicos de referencia de acuerdo al sexo y la edad, hacen a esta especie muy atractiva y brindan la posibilidad de emplearla como modelo animal útil en el campo de la biomedicina. También contribuyen a esto los principales hallazgos histopatológicos de los PNH *C. aethiops sabaeus*, a lo cual se suma la cercanía filogenética con los humanos, la amplia disponibilidad de estos primates, su bajo costo de mantenimiento y el peligro de extinción en que se encuentran otras especies de PNH usadas durante años.

Por otra parte, los resultados aquí presentados demuestran que los PNH de esta especie replican eficientemente el VDEN-2, aun cuando no muestran los síntomas típicos de la enfermedad. No obstante, la infección viral experimental provocó alteraciones hematológicas y hemoquímicas similares a las producidas en individuos infectados con este patógeno. En este sentido, esta especie de PNH puede ser una herramienta necesaria e imprescindible para la evaluación de los nuevos candidatos que se desarrollen en el futuro.

Este trabajo se circunscribe a la infección con un patógeno que produce la enfermedad viral de mayor distribución a nivel mundial [28], VDEN-2, pero ello no limita que estos PNH puedan emplearse para el estudio de otras enfermedades víricas, bacterianas, micóticas o parasitarias que afecten al hombre. Estudios futuros deberán demostrar la utilidad o no del modelo animal que aquí se caracteriza, para el estudio de otros patógenos humanos de relevancia en el campo de la biomedicina.

61. Bennett BT, Abee CR, Henrickson R. Nonhuman Primates in Biomedical Research. Diseases. San Diego: Academic Press; 1998.

62. Rodríguez MR, Baluja IB, Bermúdez S. Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. Rev Biomed. 2007;18:47-59.

63. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. J Infect Dis. 1973;128(1):7-14.

64. Freire M, Marchevsky R, Almeida L, Yamamura A, Caride E, Brindeiro P, et al. Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(2):203-8.

65. Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, López C, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. Antiviral Res. 2008;80(2):194-9.

66. Althouse BM, Durbin AP, Hanley KA, Halstead SB, Weaver SC, Cummings DA. Viral kinetics of primary dengue virus infection in non-human primates: a systematic review and individual pooled analysis. Virology. 2014;452-453:237-46.

67. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villingier F, Ansari AA, Perng GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. Blood. 2010;115(9):1823-34.

68. Martínez E. Dengue. Estudios Avanzados. 2008;22(64):33-52.

69. Samanta J, Sharma V. Dengue and its effects on liver. World J Clin Cases. 2015;3(2):125-31.

De modo general los modelos animales que se emplean para abordar enfermedades humanas, ya sean infecciosas o de otra etiología, se utilizan comúnmente para ensayos exploratorios y de eficacia. No obstante, el empleo de PNH en estudios de seguridad es menos común y se limita por lo general a estudios diseñados para comprender la génesis o el mecanismo asociado a un efecto adverso identificado en estudios preclínicos convencionales de toxicología [96].

Por su parte, la administración de dos productos biotecnológicos destinados al tratamiento del cáncer, en PNH de la especie *C. aethiops sabaues*, no causó

alteraciones conductuales, clínicas, hematológicas ni hemoquímicas. Estos hallazgos fueron similares a los obtenidos seres humanos y otras especies de primates tradicionalmente utilizados con fines experimentales. Entonces, los mismos avalan el uso de esta especie, considerada un paso intermedio apropiado que permitirá la realización de estudios toxicológicos más complejos, antes del paso de ambos productos a la fase clínica.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

70. Sun W, Eckels KH, Putnak JR, Lyons AG, Thomas SJ, Vaughn DW, et al. Experimental dengue virus challenge of human subjects previously vaccinated with live attenuated tetravalent dengue vaccines. *J Infect Dis*. 2013;207(5):700-8.

71. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, et al. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol*. 2000;74(12):5477-85.

72. Lam NP, Neumann AU, Grech DW, Whitley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 with interferon alpha. *Hepatology*. 1997;26(1):226-31.

73. Bocci V. Pharmacokinetics of interferons and routes of administration. In: Baron S, Copenhaver DH, Dianzani F, editors. *Interferon: principles and medical applications*. Galveston: University of Texas Medical Branch; 1992. p. 417-25.

74. Registro Sanitario HeberPAG (Combinación de interferón alfa 2b humano recombinante e interferón gamma humano recombinante). B-08-039-L03 (3MUI); B-08-040-L03 (10MUI). 2008.

75. Registro Sanitario HeberFERON (Interferón alfa 2b hu-rec + Interferón gamma hu-rec). B-16-156-L03. 2016.

76. García-Vega Y, García I, Collazo SE, Santely EE, Cruz A, Tuero AD, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamics characterization of a new formulation containing synergistic proportions of interferons alpha-2b and gamma (HeberPAG) in patients with mycosis fungoides: an open-label trial. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2012;13(20):2050-6511.

77. García I, Hernández I, Díaz A, González CA, Pérez S, García Y, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamics characterization of a novel formulation containing co-formulated interferons alpha-2b and gamma in healthy male volunteers. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2016;17:58.

78. Rojas R, Duncan Y, Gómez CG, Ramírez LK, Lázaro G, Hernández R, et al. Administración del HeberFERON en el carcinoma basocelular palpebral a propósito de 2 casos. *Bionat*. 2016;1(2):71-4.

79. Felger JC, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman AA, Sanchez MM, et al. Effects of interferon-alpha on Rhesus monkeys: A nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry*. 2007;62(11):1324-33.

80. Sajjad SF, Ahmed Wu, Arif A, Alam SE, Waqar J. Weight loss with interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Pak Med Assoc*. 2012;62(11):1229-32.

81. Anasagasti L, Garcia Y, Barcelona S, Lopez P, Bello I. Treatment of advanced, recurrent, resistant to previous treatments basal and squamous cell skin carcinomas with a synergistic formulation of interferons. Open, prospective study. *BMC Cancer*. 2009;9:262.

82. Schellekens H. The toxicity of human interferons in nonhuman primates. In: TC Merrigans, RM Friedman (eds). *Interferons*. New York: Academy Press; 1982.

83. Downing JF, Taylor MW, Wei KM, Elizondo RS. In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes for increased synthesis of interferon-gamma. *J Interferon Res*. 1987;7(2):185-93.

84. Perrillo RP. Chronic hepatitis B: problem patients (including patients with decompensated disease). *J Hepatol*. 1995;22(1):45-8.

85. Rodríguez JL, Valenzuela C, Marín N, Ferrero J, Ducongé J, Castillo R, et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of two recombinant human Interferon alpha-2b formulations administered intramuscularly in healthy male volunteers. *Biotechnol Appl*. 2000;17:166-70.

86. Registro Sanitario HeberPAG (Combinación de interferón alfa 2b humano recombinante e interferón gamma humano recombinante). B-08-039-L03 (3MUI); B-08-040-L03 (10MUI). 2008.

87. Registro Sanitario HeberFERON (Interferón alfa 2b hu-rec + Interferón gamma hu-rec). B-16-156-L03. 2016.

88. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*. 2016;92(1086):223-34.

89. Inker LA, Fan L, Levey AS. Assessment of renal function. In: Johnson RJ, Feehally J, Floege J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. p. 30-8.

90. Kamba T, DM McDonald. Adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(12):1788-95.

91. Genentech. Avastin. 2019 (cited 2019 October 16). Available from: <http://www.gene.com/patients/medicines/avastin>.

92. Gavilondo JV, Hernández-Bernal F, Ayala-Ávila M, de la Torre AV, de la Torre J, Morera-Díaz Y, et al. CENTAURO Group of Investigators. Specific active immunotherapy with a VEGF vaccine in patients with advanced solid tumors. Results of the CENTAURO antigen dose escalation phase I clinical trial. *Vaccine*. 2014;32(19):2241-50.

93. Wentink M, Verheul H, Griffioen A, Schaffer K, McPherson S, Early R, et al. A safety and immunogenicity study of immunization with hVEGF26-104/ RFASE in cynomolgus monkeys. *Vaccine*. 2018;36:2025-32.

94. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*. 2004;65(6):2003-17.

95. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):1061-8.

96. Morgan SJ, Elangbam CS, Berens S, Janovitz E, Vitsky A, Zabka T, et al. Use of animal models of human disease for nonclinical safety assessment of novel pharmaceuticals. *Toxicol Pathol*. 2013;41(3):508-18.

Received in September, 2019.

Accepted in October, 2019.