

Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCO1 por el método de HET-CAM

Alexander Batista^{1*}, Gisela Murillo¹, Ulpiano Pérez¹, Enieyis Tur¹, Deivys Portuondo¹, Oliver Pérez²

¹Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba 90400, PO Box 4033, Cuba.

² Instituto Finlay. Vicepresidencia de Investigaciones. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba. AP 16017.Ciudad Habana, Cuba

email: a.batista@toxi.scu.sld.cu

Los adyuvantes pueden producir irritación local en la mucosa y esto pudiera ser una limitación para su uso clínico. Para evaluar si el adyuvante vacunal AFCo1, un cocleato obtenido a partir del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*, produce irritación directa en la mucosa nasal, se estudió el efecto de su aplicación en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (MCA), por la técnica de HET-CAM (hen's egg test on chorioalantoic membrane), según el Protocolo 47 de INVITTOX, método alternativo que sustituye la clásica prueba de Draize en conejos. En este ensayo se utilizaron por cada producto a evaluar (AFCo1 o amortiguador fosfato salino como diluyente) tres huevos de gallinas White Leghorn de 10 días de embrionados; para los controles positivos de irritación (NaOH a 0,1 N y SDS al 1%) se utilizaron dos huevos para cada uno. Los productos fueron aplicados en la MCA para evaluar las lesiones de lisis, hemorragia y coagulación, a los 5 min. Las sustancias se clasificaron según una escala establecida para productos no transparentes. Adicionalmente se realizó una evaluación microscópica de las MCA tratadas para confirmar las observaciones realizadas. Al determinar el grado de severidad de las tres reacciones, después de la aplicación de AFCo1 y del diluyente, ambos clasifican como no irritantes, lo que evidencia que este cocleato no produce lesión epitelial directa. Este resultado, además, confirma la utilidad del HET-CAM para la determinación de irritabilidad nasal de adyuvantes vacunales.

Palabras clave: Adyuvante, cocleato, AFCo1, irritación mucosa, HET-CAM.

Introducción

La vía intranasal constituye una alternativa eficaz y relativamente segura para la aplicación de vacunas. En la actualidad existe una creciente tendencia al uso de esta vía de aplicación debido a que la mucosa nasal es la principal puerta de entrada de la mayoría de los agentes patógenos y posee un sistema inmune organizado capaz de inducir respuestas inmunes efectivas, incluso en sitios anatómicos distantes (1).

Sin embargo, no hay suficiente información acerca de los métodos para la evaluación preclínica toxicológica de vacunas por vía intranasal (2) y existe la preocupación de que estos productos puedan producir toxicidad local en la mucosa, como ha sido evidenciado en los casos de la toxina colérica y otras enterotoxinas utilizadas como adyuvantes vacunales (3).

Gizurason evaluó la toxicidad local de varios adyuvantes aplicados intranasalmente en curieles revelando que puede ocurrir un daño directo al epitelio nasal que propicia un contacto directo con las células linfoides de la submucosa o de los vasos linfáticos que drenan la zona, generando una vía de transporte de antígenos alternativa en comparación con el epitelio intacto, además de que el daño a la barrera epitelial puede generar una infección local oportunista (4).

Algunas emulsiones de aceite mineral utilizadas como adyuvante pueden generar irritación primaria por la presencia de hidrocarburos de cadenas cortas en la preparación, los que pueden tener un efecto detergente, disolviendo la bicapa lipídica de la membrana celular que causa lisis celular. Mannide monooleate, usado a menudo en las emulsiones w/o como un agente emulsionante, puede metabolizarse a ácidos grasos tóxicos que causan reacciones locales (5).

Otras formas de interacciones con la membrana celular que conlleva a citólisis han sido también descritas para adyuvantes del tipo saponinas derivadas de Quijalla saponaria Molina (6).

Por otro lado, la conexión directa del epitelio olfativo con el sistema nervioso central ha constituido una preocupación de las entidades regulatorias vinculadas a las vacunas intranasales, lo cual se ha puesto de manifiesto por los reportes de parálisis facial de Bell, asociadas al uso de una vacuna contra influenza por vía intranasal (7).

La evaluación del potencial irritante nasal de diversas sustancias en animales de laboratorio resulta extremadamente complejo debido a las diferencias morfológicas existentes en la cavidad y el epitelio nasal entre

* Especialista de 2do Grado en Inmunología, Profesor Asistente, Investigador Agregado. J' Laboratorio de Inmunotoxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba.

los animales de laboratorio y el hombre (8), lo cual puede resultar en diferentes respuestas de toxicidad local ante un mismo producto irritante.

Esto ha conducido a que se desarrollen nuevos métodos que contribuyan a una mejor caracterización del potencial irritante de productos que se proponen ser aplicados por vía nasal como las vacunas que, junto a los estudios que se realicen en animales, puedan lograr una mejor interpretación de los resultados.

El HET-CAM es una técnica validada por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia), que la ofrece como sustitutiva de la clásica prueba de Draize para determinar irritación ocular (9). Actualmente ha sido aprobada por las entidades regulatorias en varios países, pues ha demostrado una alta capacidad predictiva en comparación con otros métodos *in vitro* (10), además de su sencillez y bajo costo.

Teniendo en cuenta que toda sustancia irritante ocular potencialmente es un irritante nasal (11), y luego de un estudio previo realizado en nuestro laboratorio que confirmó esta relación directa, se procedió a evaluar con este método *in vitro* el potencial irritante mucosal del AFCO1, propuesto como candidato a adyuvante.

Material y Métodos

Sustancias de prueba

Cocleato (AFCO1), derivado del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (lote 603) obtenidos en el Dpto. de Inmunología de la Vicepresidencia de Investigaciones del Instituto Finlay (C. Habana) y su diluyente (amortiguador fosfato salino).

Sustancias de referencia

NaOH (Sigma) a 0,1 N y SDS (Sigma) al 1% como controles positivos (irritantes mucosales).

El estudio se llevó a cabo mediante el Protocolo No. 47 de INVITTOX de la base de datos ERGATT/FRAME de Técnicas *in vitro* en Toxicología. ISSN 0960-2194, Russell & Burch House, 96-98 North Sherwood Street. Nottingham NG1 4EE. England (12).

Se utilizaron huevos embrionados de gallinas de la raza White Leghorn, con un peso entre 50 y 60 g. Los reactivos empleados fueron NaCl al 0,9% para el lavado de la membrana, así como NaOH a 0,1 N y SDS al 1% como controles positivos.

Se utilizó material quirúrgico oftálmico, fundamentalmente tijeras y pinzas, lámpara fluorescente para observación de

las reacciones, lámpara para el examen de los embriones, cronómetro, tubos de ensayos, beaker, frascos de tapas esmeriladas, pipetas de cristal, pipetas Eppendorf, pipetas Pasteur, bandejas esmaltadas y frascos lavadores.

Procedimiento

Los huevos fueron colocados en la incubadora, manteniéndolos a una temperatura de $37,5 \pm 0,5$ °C y una humedad relativa de $62,5 \pm 7,5\%$, con la cámara de aire hacia arriba y sin rotar hasta que alcanzaron los 10 días de incubación. Los embriones fueron revisados bajo la luz de la lámpara para determinar su viabilidad y desechar los que presentaron algún defecto, como rasgaduras o aumento de la porosidad; en ese momento se marcó con un lápiz la cámara de aire.

Se abrió cuidadosamente el cascarón por la cámara de aire ya marcada, para exponer la membrana blanca, la cual se humedeció con una solución de NaCl al 0,9%. Después de este procedimiento se regresó a la incubadora para evitar su enfriamiento por un período de tiempo entre 20 y 30 min antes de realizar los pasos subsiguientes.

Posteriormente se retiró dicha membrana cuidadosamente con material quirúrgico oftálmico, evitando dañar la MCA que quedó expuesta y se evaluó su integridad y utilidad para ser usada.

Se procedió a añadir las soluciones estándar de irritación (sustancias de referencia); se observaron las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extravasculares) por un tiempo de 5 min y se registró el tiempo en segundos en que apareció cada una para calcular el índice de irritación (I.I.) a través de la fórmula siguiente:

$$I.I = (301 - \text{seg H} / 300) 5 + (301 - \text{seg L} / 300) 7 + (301 - \text{seg C}) 9$$

donde:

H = Hemorragia, L = Lisis de los vasos, C = Coagulación
seg = El tiempo en segundos en que aparece cada reacción.

Se determinó el I.I. para 2 huevos con el sodio dodecil sulfato (SDS) al 1% y 2 huevos con NaOH 0,1 N.

Estas dos son las sustancias de referencia que constituyen los controles positivos que recoge el protocolo y que se utilizan para el montaje de la técnica.

Para evaluar el efecto irritante de AFCO1 y de su diluyente, se colocó cada uno por triplicado (tres huevos) sobre la MCA directamente cubriendo no menos de la mitad de su superficie durante 5 min; después de este tiempo se lavó cuidadosamente con NaCl al 0,9% para eliminar la misma de la superficie de la membrana.

Clasificación

Se evaluó la severidad de las tres reacciones posibles (lisis, hemorragia y coagulación) a los 5 min de aplicadas las sustancias de ensayo, clasificándose de acuerdo con la siguiente escala:

0 = no lesión, 1 = ligera, 2 = moderada, 3 = severo/ corrosivo

Si a los 5 min no se detecta reacción en cualesquiera de las tres variantes, clasifica como 0 y no se requiere repetir el ensayo al min.

Si se observa alguna reacción de escala 3 en cualesquiera de los tres tipos de reacciones, entonces se repite el ensayo utilizando otros tres huevos embrionados, pero con un tiempo de exposición del producto de 1 min y se reevalúa la reacción obtenida, utilizando la misma escala. La evaluación final de la magnitud de irritabilidad se asigna atendiendo a la puntuación más alta obtenida en tres réplicas.

Estudio histopatológico

Las MCA fueron cuidadosamente extraídas y fijadas en formaldehído al 10%, luego deshidratada con alcohol a diferentes grados (70%, 96%, absoluto) y posteriormente incluidos en parafina.

Los bloques fueron cortados en un microtomo de parafina y los cortes montados en portaobjetos. Estas láminas pasaron por varios pasos de xilol para eliminar los restos de parafina; se colorearon con hematoxilina-eosina y luego se montaron con bálsamo Canadá y un cubreobjeto para su posterior observación en el microscopio óptico (Zeiss, Alemania).

Método estadístico

Para los controles positivos se calculó la media aritmética del índice de irritación calculado para el NaOH a 0,1 N y el SDS al 1% (dos por cada sustancia) (12) y se determinó si se encontraban en el intervalo estimado para cada una de ellas (10 ± 2 para el SDS y 15 ± 3 para el NaOH 0,1 N). Con esto se determina si el sistema está en óptimas condiciones. Las sustancias de ensayo se evalúan atendiendo al grado de severidad de las lesiones.

El I.I. para cada huevo, de acuerdo con la poca variabilidad de la técnica empleada, no debe diferir, por lo que se emplea el promedio para el análisis de los datos (12).

Resultados y Discusión

La utilización de la MCA de embriones de pollo para el estudio de irritación de la mucosa ocular y nasal se basa en que la membrana MCA presenta un epitelio similar a la mucosa ocular y nasal, con una amplia red vascular que permite evaluar las lesiones de hemorragia, lisis y coagulación que ocurren en dichos vasos, así como la desnaturalización de las proteínas extravasculares, lo cual indica diversos grados de irritación.

Además, estos embriones de 10 días no poseen un sistema nervioso desarrollado y por lo tanto no están sometidos al sufrimiento que pudiera producir una irritación severa, cumpliéndose así con el principio de las 3Rs que deben tener los métodos alternativos en toxicología: refinamiento, que significa reducción del sufrimiento animal, reemplazamiento y reducción en el número de animales de laboratorio a emplear (13).

Tabla 1. Índice de irritación de los controles positivos para la técnica de HET-CAM.

Controles positivos de irritación	I.I. calculado	I.I. estimado para el modelo
NaOH a 0,1 N	17,87	15 ± 3
SDS al 1%	11,82	10 ± 2

Tabla 2. Evaluación de la irritabilidad en mucosa de AFCo1 y su diluyente por HET-CAM.

Productos de ensayo	Réplicas	5 min			1 min (Reevaluación)			Clasificación
		L	H	C	L	H	C	
AFCo1	MCA 1	1	0	0	0	0	0	No irritante
	MCA 2	0	0	0	0	0	0	
	MCA 3	1	0	0	0	0	0	
Diluyente	MCA 1	0	0	0	-	-	-	No irritante
	MCA 2	0	0	0	-	-	-	
	MCA 3	0	0	0	-	-	-	

Leyenda: MCA: Membrana corioalantoidea; L: Lisis; H: Hemorragia; C: Coagulación

Antes de realizar la evaluación del AFCo1 y su diluyente, se ajustó el sistema según establece el protocolo con las dos sustancias irritantes de referencia (Tabla 1).

Al evaluar las sustancias de referencia NaOH a 0,1 N y SDS al 1% como controles positivos, los resultados fueron I.I. (SDS 1%) = $11,82 \pm 0,1$ e I.I. (NaOH 0,1N) = $17,87 \pm 0,09$. Ambos valores se encuentran dentro del rango esperado, según se refiere en el protocolo original: 10 ± 2 para el SDS y 15 ± 3 para el NaOH 0,1 N, lo que indicó que el modelo estaba en óptimas condiciones.

Con esta premisa se evaluó el potencial irritante del adyuvante AFCo1 y de su diluyente. Atendiendo a las propiedades organolépticas del producto, los resultados fueron evaluados, según establece el protocolo para sustancias sólidas y no transparentes, teniendo en cuenta la severidad de la reacción, lo que permitió la clasificación final de la misma.

Al no observarse lesiones de hemorragia y coagulación, y sólo lisis ligera a los 5 min en dos de tres MCA tratadas con AFCo1, se procedió a repetir el ensayo pero evaluando la reacción al min. En este caso no se detectó reacción de lisis.

Por su parte el diluyente no mostró reacción alguna a los 5 min, por lo que no se repitió el ensayo al min. Aunque el protocolo original solo recomienda repetir la evaluación al min cuando se obtenga una escala 3 de irritación.

En este caso se realizó una reevaluación al min para confirmar que este efecto de lisis ligera en solo dos embriones no tiene repercusión para clasificar la sustancia, pues de las tres lesiones, la lisis constituye el indicador de menor peso. Con estos resultados, tanto AFCo1 como su diluyente clasifican como no irritantes (Tabla 2).

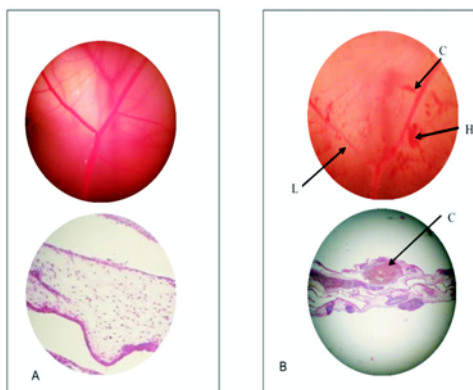


Figura 1. Microfotografía de la membrana corioalantoidea (MCA) luego de la exposición a: A) AFCo1 y su diluyente, apariencia normal del epitelio y sus componentes B) Control positivo de irritación NaOH a 0,1 N, donde se aprecia hemorragia (H), lisis vascular (L) y coagulación (C).
Círculos superiores 8X, círculo inferior izquierdo 100x, círculo inferior derecho 200x

Teniendo en cuenta que un inconveniente del método HET-CAM es que la valoración de las lesiones tiene un componente subjetivo, en este ensayo se realizó adicionalmente un estudio histopatológico de la MCA que permitió confirmar los resultados obtenidos, es decir, los controles positivos de irritación que, además, sirven para calibrar el modelo, donde se evidenciaron las lesiones de hemorragia, lisis y coagulación (Figura 1), mientras que los productos de ensayo no arrojaron lesiones epiteliales ni vasculares, excepto lisis ligera en dos MCA donde se aplicó AFCo1 durante 5 min, lo cual no es significativo de lesión irritativa cuando aparece aislada y sin el resto de los componentes, particularmente si en la reevaluación al min no se detecta esta reacción.

Hay que significar que la utilización de un estudio histopatológico en el HET-CAM permite aumentar mucho más la sensibilidad del método (14).

Existen otras variantes de HET-CAM y métodos in vitro que pueden ser utilizados para la evaluación del efecto irritante de diversas sustancias, pero en este caso se eligió el HET-CAM debido a que además de ser un método validado internacionalmente, así como en Cuba y en nuestro laboratorio (15), la formulación del adyuvante AFCo1 contiene partículas en suspensión, lo que le ofrece un aspecto opalescente, semejante a otros adyuvantes de su tipo, y en esos casos este método, a diferencia de otros, contempla una variante que permite evaluar el grado de severidad de la irritación evaluados en tiempos fijos.

En relación con el resultado de no irritante, obtenido con la formulación evaluada, puede explicarse al analizar la estructura de AFCo1, consistente en vesículas de membrana externa (VME) o proteoliposoma de *N. meningitidis B*, enrollada en forma de caracol o cocleato que ofrece propiedades excelentes de estabilidad y muy poca exposición de sus elementos moleculares antigénicos y otras estructuras en la superficie externa (16).

Es posible deducir de antemano la poca posibilidad de provocar irritación mucosal, ya que no existen suficientes elementos con propiedades para generar lisis de membrana o necrosis celular directa.

Cuando se realizan estudios de tolerancia local in vivo de una formulación, en los cuales se aplica un esquema de vacunación comparable con el que se empleará en la práctica clínica, en ocasiones es difícil diferenciar un efecto irritante directo e inmediato producido por la sustancia, de aquel que se genera como consecuencia de la estimulación del sistema inmune innato o específico por una acción farmacológica.

De este modo es posible que suceda que un producto sea no irritante, sin embargo, en el estudio in vivo se encuentra una

respuesta inflamatoria local, como el reportado por Infante y cols. para este mismo producto (2).

Esto se debe a que los mecanismos de irritación directa, efecto que se busca con el HET-CAM, son diferentes al efecto local que se observa días después, donde interviene un proceso inflamatorio como consecuencia del efecto adyuvante.

De este modo, para el caso de las formulaciones vacunales, la reactogenicidad local puede ser inducida como resultado del efecto inmunofarmacológico del adyuvante y el antígeno, o debido a otros componentes no activos de la formulación como los diluentes, estabilizadores, preservativos u otros componentes (17), los cuales pudieran ejercer un efecto lesivo directo en el epitelio, razón por la cual en los estudios de este tipo también se evalúa el diluyente.

La utilización del HET-CAM como método *in vitro* para evaluar este efecto irritante directo puede complementar los estudios *in vivo* para poder diferenciar un efecto de otro.

Teniendo en cuenta la dificultad inherente a los estudios de toxicidad local por vía intranasal en los cuales los modelos animales difieren en su estructura anatómica de la cavidad nasal, se recomienda el empleo de más de un modelo para estos estudios; además, se requieren nuevos métodos que permitan una mejor predicción del nivel de toxicidad (17).

En este sentido nuestro trabajo contribuye a ese objetivo, pues pone de manifiesto la utilidad de un método alternativo *in vitro*, internacionalmente validado para la detección de irritantes oculares, que ha mostrado potencialidades para su aplicación en estudios de toxicidad de adyuvantes.

Otros adyuvantes y vacunas han sido evaluados también con el HET-CAM en estudios de toxicidad como es el caso del Montanide en sus variantes del tipo IMS, desarrollados por Seppic en Francia (18), y en nuestro laboratorio un candidato vacunal para la fiebre aftosa (19).

Como conclusión, el trabajo aporta evidencias a favor de que la aplicación intranasal de AFCo1 no produce irritación directa en la mucosa, por lo que, si tenemos en cuenta que este es un adyuvante que sirve de base para ser utilizado en formulaciones vacunales preventivas, una vez probada su eficacia, la demostración de su baja toxicidad es determinante para su aprobación por las agencias regulatorias para uso en humanos. Este resultado contribuye a demostrar que puede ser un producto seguro para ser utilizado intranasalmente.

Referencias

1. O'Hagan D, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Rev* 2003;2: 727-35.

2. Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, Zayas C, et al. Ensayo de inmunogenicidad y de toxicidad local del cocleato de *Neisseria meningitidis* en ratas Spregue Dawley. *VacciMonitor* 2009; 18(1):1-7.
3. Fujihashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee J R A dilemma for mucosal vaccination efficacy versus: toxicity using enterotoxin- based adjuvants. *Vaccine* 2002; 20:2431-38.
4. Gizurarson S, Georgsson G, Aggerbeck H, Thorarinsdóttir H and Heron I. Evaluation of local toxicity after repeated intranasal vaccination of guinea-pigs. *Toxicology* 1996; 107(1): 61-8.
5. Hardegree MC and Pittman M. Influence of antigens on release of fatty acids from Arlacel A (mannide monooleate). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1966;123:79.
6. Sun HX, Xie Y, Ye Y. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 2009; 27: 1787-96.
7. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004; 350: 896-903.
8. Harkema JR. Comparative pathology of nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ Health Perspective* 1990;85: 231-8.
9. Balls M. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1995; 9:871-929.
10. Ying Y, Xinfeng Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, et al. Combined *in vitro* test as an alternative to *in vivo* eye irritation tests. *ATLA* 2010;38: 303-14.
11. Doty RL, Cometto-Muñiz E, Jalowayski A, Dalton P, Kendal-Reed M, Hodgson M. Assessment of Upper Respiratory Tract and Ocular Irritative Effects of Volatile Chemicals in Humans. *Crit Rev Toxicol*, 2004; 34(2): 85-142.
12. Spielmann H. HET-CAM Test. The ERGATT/FRAME. Databank of *in vitro* techniques. *INVITTOX* 1992; IP-47: 1-9.
13. Balls M Animal experimentation and the three Rs: past, present and future. *ATLA* 2009; 37, suppl2:1-6.
14. Djabari Z, Bauza E, Dal Farra C, Domloge N The HET-CAM test combined with histological studies for better evaluation of active ingredient innocuity. *Int J Tissue React*. 2002;24(4):117-21.
15. Murillo G, Pérez U, Tur E, Vinardell P, García G, Pascual J. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina para la evaluación de la irritabilidad ocular. *Rev Toxicol* 2003;20:187-92.
16. Pérez O, Bracho G, Lastre M, et al. Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. 2002 Patent application Cu 2002-0292.
17. Brennan F, Dougan G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* 2005;23:3210-22.

18. Seppic. Montanide™ IMS: An innovative range of adjuvants for vaccines and injectables. P/0891/GB/03/November 2002. France: www.seppic.com.
19. Batista A, Quattrocchi V, Olivera C, Langellotti C, Pappalardo J, Di Giacomo S. et al. Adjuvant effect of Cliptox™ on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. *Vaccine* 2010;28: 6361–66.

Evaluation of the mucosal irritation of AFCo1 adjuvant by HET-CAM method

Abstract

Adjuvants can cause local irritation of the mucosa and this might be a limitation for their clinical use. In order to evaluate if AFCo1, a novel intranasal adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure from *Neisseria meningitidis* B, produces mucosal irritation, the direct effect after its application on the chorioallantoic membrane (CAM) of hen's eggs was studied using HET-CAM (hen's egg test on chorioallantoic membrane), according to protocol 47 of INVITTOX, an *in vitro* validated method that substitutes the classic Draize's test in rabbits. Three 10-days-old eggs were used for each evaluated product (AFCo1 or PBS as vehicle) and two eggs for each positive control of irritation (NaOH a 0.1 N y SDS at 1%). The products were applied on the CAM to evaluate the grade of lyses, haemorrhage and coagulation, at five minutes. The products were classified according to an established scale for non transparent substances. Additionally, a microscopic evaluation was carried out to confirm previous results. When determining the severity degree of the three reactions after the application of AFCo1 and the diluent, they show to be non irritant, what demonstrates that this cochleate does not produce direct epithelial damage. Our results also reveal the utility of HET-CAM as tool for the evaluation of mucosal irritation of vaccine adjuvants.

Keywords: Immunomodulation, 5 Fluorouracil, CM-95 Solution, haematopoietic tissue, mice.

Recibido: Septiembre de 2010

Aceptado: Octubre de 2010