

EVALUACIÓN DE TOXICIDAD REPRODUCTIVA Y DEL DESARROLLO: SU IMPORTANCIA EN LA FASE PRECLÍNICA DE NUEVAS VACUNAS

MARÍA FLORENCIA BELTRAMINO¹, FÁTIMA B. GASSER¹, ANTONELA F. STASSI^{1,2},
HUGO H. ORTEGA^{1,2}, MARÍA EUGENIA BARAVALLE^{1,3}

¹Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET), Universidad Nacional del Litoral y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Litoral, Esperanza, Santa Fe, ³Centro de Innovación, Transferencia y Estudio para el Desarrollo de Alimentos (CITEDA) - Centro Universitario Gálvez, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Gálvez, Santa Fe, Argentina

Dirección postal: María Eugenia Baravalle, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral) - Universidad Nacional del Litoral - CONICET, R. P. Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe, Argentina

E-mail: mebaravalle@fcv.unl.edu.ar

Recibido: 25-VI-2025

Aceptado: 2-IX-2025

Resumen

Los ensayos preclínicos en animales de laboratorio, especialmente aquellos dirigidos a evaluar los posibles efectos asociados a la reproducción y desarrollo de la descendencia, han cobrado importancia en los últimos años a partir del desarrollo de nuevos fármacos y vacunas requeridos tanto para niños como personas en edad fértil. La problemática actual reside en la necesidad de contar con datos confiables y de rápida obtención para permitir que el nuevo compuesto pase a la fase clínica y posterior aprobación. Dado que las mujeres embarazadas y lactantes suelen quedar excluidas de los ensayos clínicos de vacunas, incluidos los referidos a toxicidad, existe escaso conocimiento relacionado a esta población vulnerable y su descendencia. En este sentido, para los estudios preclínicos destinados a evaluar los efectos de los candidatos vacunales y terapéuticos sobre la reproducción y el desarrollo, resulta fundamental contar con modelos *in vivo* que reproduzcan los aspectos claves de la patogenia observada en la enfermedad humana. En la evaluación de la toxicidad reproductiva de las vacunas, no solo es fundamental analizar los posibles efectos sobre la fertilidad, la embriogénesis, el desarrollo y la reproducción, sino que también resulta esencial considerar las interacciones de la vacuna con el sistema inmunológico tanto de la madre como de su descendencia. En esta revisión se actualizan y describen los estudios preclínicos en animales de laboratorio para nuevas vacunas, en particular las diseñadas contra el COVID-19,

destacando aquellos sobre toxicidad reproductiva y del desarrollo publicados, como así también la normativa vigente para los mismos.

Palabras clave: ensayos preclínicos, seguridad, toxicidad reproductiva, candidatos vacunales, animales de laboratorio

Abstract

Evaluation of reproductive and developmental toxicity: its importance in the preclinical phase of new vaccines

Preclinical trials in laboratory animals, particularly those aimed at evaluating potential effects on reproduction and offspring development, have gained importance in recent years due to the development of new drugs and vaccines intended for both children and individuals of reproductive age. The current challenge lies in the need for reliable and rapidly obtainable data to enable the transition of new compounds to clinical phases and eventual approval. Since pregnant and breastfeeding women are often excluded from clinical vaccine trials, including those assessing toxicity, there is limited knowledge about this vulnerable population and their offspring. In this context, preclinical studies designed to assess the effects of vaccine and therapeutic candidates on reproduction and development must rely on *in vivo* models that accurately replicate key aspects

of the pathogenesis observed in human disease. When evaluating the reproductive toxicity of vaccines, it is essential not only to assess potential effects on fertility, embryogenesis, development, and reproduction, but also to consider the interactions of the vaccine with the immune system of both the mother and her offspring. This review updates and describes preclinical studies in laboratory animals for new vaccines, particularly those developed against COVID-19, highlighting published studies on reproductive and developmental toxicity, as well as the current regulatory framework governing such studies.

Key words: preclinical trials, safety, reproductive toxicity, vaccine candidates, laboratory animals

PUNTOS CLAVE

Conocimiento actual

- El hallazgo de un nuevo principio activo implica estudiar su obtención, actividad biológica y toxicidad. En los últimos años, los estudios preclínicos centrados en efectos sobre la reproducción y el desarrollo han cobrado relevancia, especialmente por la necesidad de medicamentos y vacunas destinados a niños y personas en edad fértil.

Contribución del artículo al conocimiento actual

- Esta revisión actualiza los estudios preclínicos en animales de laboratorio sobre nuevas vacunas, especialmente contra enfermedades infecciosas emergentes, enfocándose en la toxicidad reproductiva y del desarrollo. Dichos estudios contribuyen a garantizar la seguridad de las vacunas antes de su fase clínica, apoyan decisiones regulatorias fundamentadas y fortalecen la confianza pública.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso complejo y abarca una serie de pasos que van desde el descubrimiento del nuevo compuesto hasta la aprobación del producto ante entidades regulatorias para su posterior comercialización. Dentro de este proceso, los ensayos preclínicos desempeñan un papel fundamen-

tal en evaluar la eficacia y seguridad del nuevo principio activo antes de ser sometido a ensayos clínicos en humanos. Para ello se requieren modelos *in vitro* e *in vivo* ejecutados mediante procedimientos previamente validados y siguiendo guías internacionales de referencia¹. En estos ensayos se tiene en cuenta las características físicas y químicas del compuesto, la indicación terapéutica, la población objetivo a ser tratada, la vía y duración de su administración, entre otros factores¹. La evaluación de la eficacia implica la observación del efecto terapéutico esperado en diferentes especies de animales de laboratorio. Por otro lado, las pruebas de seguridad en esta fase, incluyen la determinación global de la toxicidad (aguda, subaguda y crónica) y según el tipo de fármaco e indicación, los efectos sobre el aparato reproductor, embriogénesis y los posibles daños genéticos (mutagénesis y/o carcinogénesis)^{2,3}. Estos estudios permiten caracterizar y prevenir los potenciales efectos adversos que podrían ocurrir en el ensayo clínico que se realizará posteriormente⁴.

Lograr la aprobación de nuevos fármacos en el mercado es un proceso prolongado, costoso y puede llevar una inversión por parte de las compañías farmacéuticas de un promedio de 2.6 mil millones de dólares y 10 años en investigación y desarrollo⁵. Según datos de la Asociación de la Industria Farmacéutica Británica el costo promedio de desarrollo de un fármaco fue de 1150 millones de dólares, donde los ensayos clínicos representan más del 50% del costo total de desarrollo del producto, el tiempo promedio de 12 años y con al menos 5 años dedicados a la fase preclínica⁶. Asimismo, la *Food and Drug Administration* (FDA) en EE. UU. entre los años 2009 y 2018 aprobó 355 nuevos medicamentos y productos biológicos. En este período, tras considerar los costos de los ensayos clínicos fallidos, el promedio de la inversión capitalizada en investigación y desarrollo para comercializar un nuevo medicamento se estimó en 985.3 millones de dólares⁷. En este contexto, el diseño lógico y en etapas de medicamentos y el desarrollo de técnicas sólidas y validadas para su análisis y evaluación, se ha convertido en una herramienta esencial para la aprobación de nuevos fármacos, como las vacunas, incrementando las probabilidades de éxito y reduciendo los costos involucrados.

Desde hace décadas, en las ciencias biomédicas son fundamentales los ensayos biológicos complejos con animales de laboratorio, no solo para comprender los mecanismos celulares como base de la vida, sino también, para favorecer el desarrollo de mejores métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales⁸. Aunque se está avanzando en su reemplazo, el uso de animales sigue siendo indispensable para realizar pruebas de potencia, alcance y seguridad de sustancias biológicas y químicas utilizadas en medicina, y para la determinación de la toxicidad de un gran número de compuestos. Los roedores son mayormente utilizados como animales de experimentación debido a la homogeneidad somática, genética y sanitaria, definiéndolos así, como animales biológicamente estandarizados. En este sentido, el uso de estos animales facilitó el avance en diversas áreas de la medicina y ha contribuido significativamente al incremento en la esperanza de vida⁸.

Nuevas vacunas

Los avances constantes en las áreas de biotecnología e inmunología han impulsado al desarrollo de nuevas plataformas vacunales y mejoras de vacunas ya aprobadas para la prevención de distintas enfermedades infecciosas⁹. Las vacunas son consideradas una clase heterogénea de medicamentos que contienen sustancias inmunogénicas capaces de inducir una inmunidad específica, activa y protectora del huésped, mayormente contra enfermedades infecciosas, sumadas a adyuvantes y conservantes⁹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado "Recomendaciones y Directrices" sobre la producción y el control de vacunas y otros productos biológicos de importancia, formando la base para asegurar la aceptabilidad de los productos a nivel mundial^{9,10}. En Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) indica en la disposición 705/2005¹¹ los requisitos para la inscripción de nuevas vacunas, así como también las normativas correspondientes al registro de productos de origen biológico. En esta se detallan las condiciones sobre la presentación de documentación técnica, establecimientos elaboradores, la información preclínica y clíni-

ca requerida¹². Según su evolución tecnológica, las vacunas se agrupan en tres categorías. Las vacunas de primera generación, como aquellas que emplean microorganismos completos (virus, bacterias) vivos atenuados o inactivados, capaces de generar una importante respuesta inmunitaria. Las vacunas de segunda generación, también llamadas recombinantes, incorporan segmentos o subunidades proteicas de origen viral mediante técnicas de biología molecular, sin posibilidad de replicación del virus. Por último, las vacunas de tercera generación, están basadas en material genético (ADN o ARN) vehiculado mediante plásmidos, los cuales llevan la información necesaria para producir dentro del receptor la molécula diana inmunogénica que origina la respuesta inmunitaria¹³. En la actualidad, los estudios preclínicos sobre seguridad de candidatos vacunales, incluidas las vacunas de segunda generación, siguen los principios generales de la evaluación toxicológica de medicamentos, centrándose en identificar su posible toxicidad a través de la evaluación de efectos locales y sistémicos. Para las vacunas que incluyen adyuvantes, existen sinergias e interacciones potenciales entre los mecanismos de acción de los antígenos de las vacunas y los adyuvantes. Si bien los coadyuvantes normalmente actúan potenciando la respuesta inmune, en ciertos casos pueden causar cantidades excesivas de mediadores proinflamatorios y pirogénicos que conducen a una exacerbación de los efectos locales y sistémicos¹⁴. Es por ello que todos los componentes de la formulación, son sometidos a ensayos preclínicos.

Los estudios preclínicos se diseñan y ejecutan en base al candidato vacunal, la población a ser tratada y el régimen de dosificación que se aplicará en el uso clínico¹⁵. Cuando se administra una vacuna se producen diversas interacciones, por lo que, identificarlas y clasificarlas permite diseñar ensayos más específicos para una evaluación más precisa. En este contexto, la toxicidad intrínseca es aquella causada directamente por algún componente de la vacuna, excipiente o adyuvante; la toxicidad asociada con la farmacodinamia es originada por la activación de linfocitos T o linfocitos B; y la toxicidad biológica está vinculada a procesos patológicos o condiciones preexistentes. También puede ocurrir la

toxicidad causada por contaminantes o impurezas, como restos celulares de la línea celular huésped y la toxicidad derivada de las interacciones entre diferentes compuestos dentro de la misma vacuna, especialmente en el caso de las vacunas combinadas¹⁶. Por otro lado, como un componente importante de los estudios farmacocinéticos preclínicos y que contribuyen a interpretar los hallazgos farmacológicos y toxicológicos no clínicos se encuentran los estudios de biodistribución. Estos estudios permiten caracterizar la presencia, persistencia y eliminación del fármaco o vacuna a nivel molecular, tanto en los tejidos diana como en una variedad de otros tejidos no diana¹⁷.

Con respecto a la especie de animal de laboratorio recomendada, el perfil de seguridad de un producto debe caracterizarse en una especie sensible a los efectos biológicos de la vacuna. En este sentido, la especie debe ser sensible al organismo patógeno o a la toxina y debe desarrollar una respuesta inmunitaria al antígeno de la vacuna⁹. En general, una sola especie animal relevante es suficiente para su uso en estudios de toxicidad que respalden el inicio de ensayos clínicos. Sin embargo, hay situaciones en las que se necesitan dos o más especies para caracterizar el producto, cuando no se comprende el mecanismo de protección inducido por la vacuna o se trata de tecnologías innovadoras con un perfil de seguridad poco desarrollado⁹.

La selección de un modelo animal adecuado para los estudios preclínicos es de suma importancia para generar resultados reproducibles y confiables. En este sentido, la disponibilidad de múltiples modelos permitió, en las últimas décadas, el desarrollo y la evaluación de distintos fármacos y vacunas tanto en un contexto terapéutico como profiláctico. En el caso de virus, debido a la variabilidad en la patogénesis viral, el modelo animal más representativo para la infección viral humana difiere entre las familias de virus. Los modelos animales más utilizados en la investigación preclínica incluyen roedores (ratones y ratas) y primates no humanos (macacos y chimpancés)¹⁸. Por ejemplo, recientemente, González-Domínguez y col.¹⁹ desarrollaron una nueva estrategia de vacunación contra influenza B basada en virus de influenza B inactivados que presentan hemaglutininas (mHA). Esta vacuna se evaluó en ratones para simular con

precisión la inmunidad humana preexistente contra los virus de la influenza B. Estos estudios preclínicos, con la estrategia mHA, representan un paso relevante hacia la posibilidad de una vacuna universal contra el virus de la influenza B en ensayos clínicos. Otros trabajos han reportado en los últimos años la evaluación de diferentes vacunas para influenza en ratas y macacos, demostrando inmunogenicidad y seguridad, sin evidencia de toxicidad sistémica^{20,21}.

En 2019, la pandemia de COVID-19 originó una crisis sanitaria sin precedentes²². Se confirmaron 776 millones de casos del síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2), y 7.1 millones de muertes hasta agosto del 2024²³. A raíz de esto surgió una demanda creciente de soluciones innovadoras que abordan el desarrollo, la fabricación y la infraestructura necesarios para asegurar la disponibilidad de nuevas vacunas eficaces y seguras para afrontar la pandemia²⁴. En este sentido, actualmente se cuentan al menos cinco tecnologías principales en las que se puede basar una vacuna y que se han empleado para el desarrollo de vacunas contra COVID-19: vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas, vacunas basadas en subunidades/péptidos, vacunas basadas en vectores y vacunas basadas en ácidos nucleicos²⁵. En el caso del SARS-CoV-2, se ha demostrado que los ratones y las ratas no son susceptibles debido a la incapacidad del virus para entrar en las células de estos roedores a través del receptor ortólogo del receptor de entrada humano denominado ACE2²⁶. No obstante, se han desarrollado modelos transgénicos murinos para profundizar el estudio de la enfermedad COVID, como los ratones K18-hACE2, originalmente desarrollados para el estudio del SARS-CoV-1 y de gran relevancia en el contexto actual²⁷⁻²⁹. Los ratones transgénicos K18-hACE2 infectados con el SARS-CoV-2 son capaces de presentar muchos de los signos clínicos causados por el SARS-CoV-2 en humanos y gracias a esto pueden ser utilizados como un modelo preclínico propicio para el estudio, tanto de la patogénesis como para la evaluación de posibles candidatos terapéuticos y preventivos contra la enfermedad del COVID-19³⁰. En este contexto, Kenneth y col.³¹ demostraron la eficacia del modelo evaluando IFN- λ 1a pegilado como tratamiento para COVID-19. En otro estudio realizado por Hoffman y col.³² los ratones

K18-hACE2 fueron inmunizados con un candidato vacunal basado en vectores adenovirales y expuestos al SARS-CoV-2 mediante administración intranasal, simulando la vía de contagio en humanos. Estos animales mostraron protección significativa, como así también carga viral reducida en el pulmón y encéfalo. Por otro lado, Berengeno y col.³⁰ a partir de ratones hemocigotas K18-hACE2-Tg/0, lograron generar una colonia de ratones homocigotas K18-hACE2-Tg/Tg controlados mediante la genotipificación por PCR, permitiendo desarrollar una colonia estable de ratones homocigotas K18-hACE2-Tg/Tg que pueden ser utilizados para la evaluación preclínica de candidatos vacunales o antivirales.

Hasta el año 2021, once vacunas contra COVID-19 fueron autorizadas para su administración a gran escala debido a sus mínimos efectos secundarios, elevada inmunidad, incluida la respuesta de anticuerpos neutralizantes, así como a su comprobada eficacia³³. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la OMS ha aprobado hasta el momento diez vacunas contra la COVID-19, para las cuales ha emitido recomendaciones de uso (Pfizer/BioNTech, AstraZeneca/Oxford, Janssen, Moderna, Sinopharm, Sinovac, Bharat, Novavax, CanSino y Valneva)³⁴. En Argentina actualmente las vacunas disponibles son Spikevax® monovariante XBB.1.5 (Moderna) para esquema inicial y refuerzos desde los 6 meses de edad y Comirnaty® bivalente Original/Omicron BA.4/BA.5 (Pfizer-BioNTech), indicada para refuerzo a partir de los 12 años.

Sin embargo, otros candidatos vacunales se han desarrollado y evaluado mediante ensayos preclínicos en los últimos años³⁵⁻⁴⁵. Entre ellas, un candidato vacunal Gamma-RBD producido en Argentina ha demostrado ser seguro en estudios preclínicos de seguridad en ratones. Actualmente, esta vacuna denominada ARVAC CG exhibe un perfil de seguridad satisfactorio y una robusta respuesta de anticuerpos neutralizantes en estudios clínicos y ha sido aprobada y autorizada por ANMAT en Argentina para su uso como refuerzo, convirtiéndose en la primera vacuna desarrollada y producida en la región⁴⁵⁻⁴⁷.

Por otro lado, dentro de los desarrollos producidos en Argentina, CoroVaxG.3 es una vacuna de segunda generación basada en una plataforma de adenovirus no replicativo cuyo objetivo

fue mejorar la inmunodominancia del transgén de la proteína Spike (S) de SARS-CoV-2 y consiste en un vector adenoviral híbrido basado en hAdV5 (adenovirus humano 5).

Mediante ensayos *in vivo* en ratones Balb/c, una dosis única de CoroVaxG.3 indujo una potente inmunidad humoral y de células T, ambas con una duración de al menos 5 meses. Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes no disminuyeron luego de 5 meses, demostrando que en este tipo de vacunas es un candidato probable para ser evaluado en otros ensayos preclínicos y posteriormente en ensayos clínicos²⁸.

Adicionalmente, Vinzón y col.⁴¹ utilizaron el modelo preclínico de ratones K18-hACE2 antes descrito, para evaluar la capacidad de protección y neutralización cruzada de la vacuna CoroVaxG.3-D.FR que expresa variantes de la proteína S compatibles con las variantes Delta Plus, Gamma y Ómicron.

En este contexto, el propósito de la evaluación preclínica de una vacuna o candidato vacunal es examinar la toxicidad de todos los componentes presentes en la formulación, sumado al análisis de la respuesta inmune inducida y proporcionando además información clave para identificar posibles órganos diana y determinar una dosis inicial segura en estudios clínicos¹⁵.

Evaluación de toxicidad reproductiva y del desarrollo

Las vacunas preventivas se utilizan cada vez más durante el embarazo, con la intención de proteger al neonato de enfermedades infecciosas mediante la inmunidad materna. La aplicación adecuada y en el momento oportuno de las vacunas durante el embarazo brinda protección tanto a la madre como al feto y, en ciertos casos, también al recién nacido. No obstante, algunas vacunas no se recomiendan durante el embarazo si los riesgos potenciales superan los beneficios esperados. En determinadas circunstancias clínicas, la vacunación con algunas de ellas puede considerarse apropiada⁴⁸.

Las vacunas elaboradas con virus vivos atenuados pueden atravesar la placenta y provocar una infección en el feto. Por ello, su uso está contraindicado durante el embarazo debido a los posibles riesgos, tanto para la madre como para el feto. Dentro de las vacunas contraindi-

cadadas en el embarazo se encuentran, la vacuna contra el sarampión, paperas, rubéola, bacilo de Calmette-Guérin, herpes zóster, y virus del papiloma humano⁴⁸. Por otro lado, las vacunas elaboradas con virus inactivados o virus vivos, cuando se administran a mujeres en período de lactancia, no representan un riesgo para la seguridad de la lactancia ni para la madre ni para el hijo, ya que, en general, no se eliminan a través de la leche materna. Las únicas excepciones son las vacunas contra la viruela y la fiebre amarilla. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, USA) aconseja que, en caso de que una mujer haya sido vacunada contra la viruela durante el embarazo o el período de lactancia, se abstenga de amamantar debido al posible riesgo de transmisión del virus vaccinia por contacto directo entre la madre y el hijo. Sin embargo, un estudio que analizó si el virus de la vacuna contra la varicela se encuentra en la leche materna después de ser aplicada a mujeres lactantes no encontró evidencia de su presencia en la leche. En cambio, la vacuna contra la fiebre amarilla debe evitarse durante la lactancia, ya que se han documentado dos casos de enfermedad neurotrópica aguda en lactantes cuyas madres recibieron esta vacuna⁴⁸⁻⁵⁰.

En este contexto, mediante ensayos preclínicos en animales de laboratorio y previo al uso en humanos, se ha evaluado la toxicidad reproductiva y del desarrollo de diferentes vacunas^{23,39,44,51-56}. Estos estudios generalmente no son requeridos para las vacunas indicadas durante la niñez, sin embargo, si la población objetivo para la vacuna incluye mujeres embarazadas y personas en edad potencialmente fértil se deben considerar estudios de toxicidad reproductiva y del desarrollo^{15,55}. Para una vacuna preventiva, las evaluaciones de toxicidad reproductiva generalmente se dirigen a estudios de desarrollo prenatal y posnatal, debido a que la principal importancia es determinar cualquier efecto potencial desfavorable sobre el embrión, el feto o el recién nacido en desarrollo^{15,56}. En estos estudios se incluye un seguimiento posnatal de las crías desde el nacimiento hasta el destete para evaluar el crecimiento, la actividad de lactancia, el peso corporal y la viabilidad, indicadores que se consideran relativos a un desarrollo normal¹⁵.

Respecto al estudio de los efectos sobre el desarrollo pre y posnatal, el objetivo es detectar efectos adversos en la hembra gestante y lactante, en el desarrollo del feto y en la descendencia tras la exposición de la hembra, desde la implantación hasta el destete. Dado que las manifestaciones del efecto inducido durante este período pueden retrasarse, las observaciones deben continuar hasta la madurez sexual. Por lo tanto, un estudio pre y postnatal se divide en dos etapas, uno que cubre el período embrionario y el otro el período fetal, el parto y la lactancia, requiriéndose una evaluación postnatal de la descendencia en ambos estudios (Fig. 1)^{15,56,58}.

Actualmente existen guías de organismos regulatorios internacionales que contribuyen al diseño de estos estudios, entre ellas, las Directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE): Prueba n.º 414: Estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal, Prueba n.º 415: Estudio de toxicidad para la reproducción en una generación, Prueba n.º 416: Estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones, Prueba n.º 421: Prueba de detección de toxicidad para la reproducción y el desarrollo, Prueba n.º 422: Estudio combinado de toxicidad por dosis repetidas con la prueba de detección de toxicidad para la reproducción y el desarrollo, "Consideraciones para estudios de toxicidad reproductiva de Vacunas Preventivas para Indicaciones de Enfermedades Infecciosas" de la FDA⁵⁷, las "Directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre evaluación no clínica de vacunas"⁹, y la "ICH S5 (R3): Directriz sobre la detección de toxicidad reproductiva y del desarrollo para productos farmacéuticos humanos" de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la cual incluye vacunas para enfermedades infecciosas⁵⁹.

De acuerdo con estas directrices, un estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo para vacunas está diseñado como un estudio de desarrollo embriofetal (EFD: del inglés *embryo-fetal development*) con una dosis inicial pre-apareamiento temprana para incluir criterios de valoración del estudio de fertilidad y desarrollo embrionario temprano (FEED: *fertility and early embryonic development*), así como con una supervivencia posnatal prolongada, a veces de hasta 45-60 días, para incluir criterios de valoración de

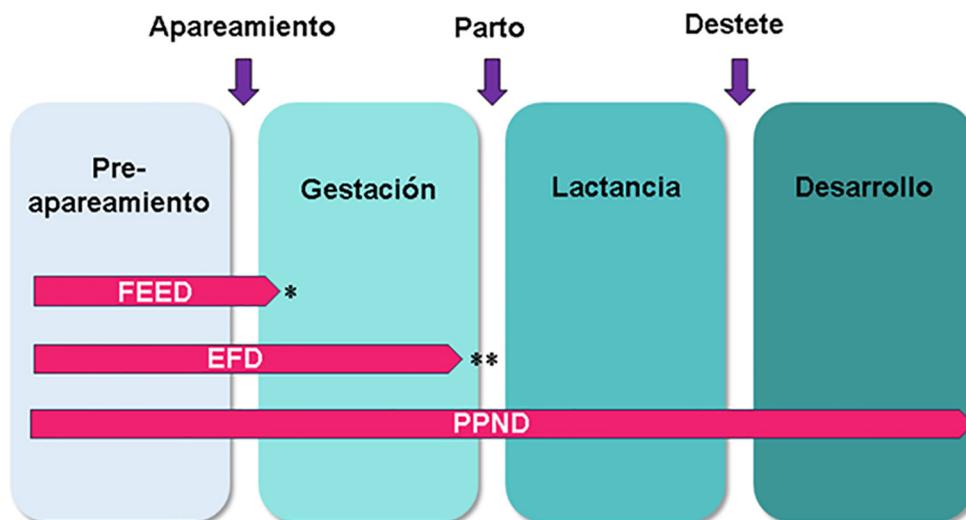
un estudio de desarrollo pre-postnatal (PPND: del inglés *pre and postnatal development*) (Fig. 1). Generalmente para estos estudios, nuevamente se considera que una sola especie es suficiente para proporcionar información importante sobre la posible toxicidad de la vacuna y la seguridad del producto durante el embarazo humano^{9, 39}.

El diseño de un estudio preclínico de toxicidad reproductiva y del desarrollo consiste básicamente en inmunizar a las hembras unas semanas antes del apareamiento para asegurar una respuesta inmunitaria óptima durante las fases críticas de la gestación (organogénesis). Posteriormente, se administran dosis de refuerzo de la vacuna durante la gestación (período embriofetal) y la lactancia (período posnatal) para evaluar los posibles efectos embriotóxicos directos de los componentes de la formulación de la vacuna y mantener la respuesta inmunitaria durante el resto de la gestación. Además se incluye el seguimiento posnatal de las crías desde el nacimiento hasta el destete, para evaluar su desarrollo y crecimiento¹⁵.

La elección del modelo animal para estos ensayos preclínicos está influenciada por las dife-

rencias entre especies en cuanto al momento y la magnitud de la transferencia de los anticuerpos maternos inducidos al feto. El transporte transplacentario de inmunoglobulinas maternas generalmente solo ocurre al final de la gestación y tiende a ser mayor en humanos y monos que en especies no primates. Para muchas vacunas, el conejo muestra una mayor tasa de transferencia prenatal de los anticuerpos inducidos que los roedores. Para ciertas vacunas que no son inmunogénicas en especies no primates, los primates no humanos pueden ser los únicos modelos apropiados⁶⁰. En este contexto, el primer requisito para los ensayos preclínicos de toxicología es que la vacuna para humanos sea inmunogénica en la especie seleccionada, en este sentido, la mayoría de las vacunas para humanos son inmunogénicas en roedores y conejos^{51,56}. Por otro lado, cuando se utiliza un adyuvante en la composición de la vacuna es necesario realizar un estudio embriofetal del compuesto en ratas y conejos. Sin embargo, una sola especie podría estar justificada si se utilizará una segunda especie para el estudio de toxicidad del desarrollo con la formulación de la vacuna en machos y hembras⁶⁰.

Figura 1 | Esquema sobre las etapas de los estudios sobre toxicidad reproductiva y del desarrollo en la fase preclínica



FEED: fertilidad y desarrollo embrionario temprano (FEED: del inglés *fertility and early embryonic development*); EFD: desarrollo embriofetal (EFD: del inglés *embryo-fetal development*); PPND: desarrollo pre-postnatal (PPND: del inglés *pre and postnatal development*)

*Momento aproximado de la implantación fetal

**Momento aproximado para cesárea un día anterior a la fecha de parto

En estos estudios la selección de la dosis debe basarse en un enfoque biológico, es decir, los niveles de dosis deben seleccionarse de forma que cada grupo de dosis produzca datos interpretables, maximizando así la utilidad del estudio tanto para la evaluación de peligros como de riesgos. Deben evitarse las dosis excesivas que causan toxicidad manifiesta y alteran la homeostasis, ya que pueden dar lugar a efectos no relevantes para la salud humana⁶¹. Finalmente, en la evaluación de toxicidad reproductiva, no solamente es indispensable evaluar efectos sobre la fertilidad, embriogénesis y desarrollo, sino también es necesario evaluar las interacciones de la vacuna con el sistema inmunológico materno y de la descendencia. Por lo tanto, los estudios posnatales son necesarios para detectar las posibles manifestaciones de toxicidad para el desarrollo, incluidos los efectos sobre el sistema inmunológico^{15,51}.

Toxicidad reproductiva y del desarrollo: antecedentes en vacunas recientes

La evaluación de la toxicidad reproductiva y del desarrollo es un aspecto fundamental en el diseño y aprobación de nuevas vacunas. Debido a ello, es importante revisar los antecedentes disponibles en relación con vacunas recientes para comprender sus posibles efectos sobre la salud reproductiva y el desarrollo embrionario. En este sentido, como ejemplo Destexhe y col.⁵⁴, evaluaron los efectos sobre la reproducción y el desarrollo de un inmunoterápico contra el cáncer (MAGE-A3), mediante estudios EFD y PPND en ratas y un tercer estudio en monos donde se evaluó la fertilidad masculina, concluyendo que el tratamiento con MAGE-A3 no tuvo efectos adversos en la fertilidad, gestación y desarrollo embrionario en ratas hembras, excepto una ligera inflamación en el sitio de inyección. Un estudio similar se realizó para la vacuna polivalente contra el virus del papiloma humano en ratas donde se observó un aumento ligero en el recuento de leucocitos, aumento en el peso esplénico de algunas hembras tratadas y sin observarse alteraciones histológicas. En este trabajo se detectaron anticuerpos tanto en madres como en crías, demostrando la transferencia transplacentaria durante la gestación y la lactancia, y finalmente se comprobó la inmunogenicidad y la ausencia

de efectos tóxicos que impacten en la reproducción y el desarrollo⁶². Por su parte, Stokes y col.⁶³, llevaron a cabo la evaluación preclínica en conejos y ratas de una vacuna contra el virus sincicial respiratorio no observando efectos sobre la gestación, el parto, la lactancia y en el desarrollo pre y postnatal de las crías. Recientemente Lee y col.⁶⁴, demostraron que la vacuna denominada BVN008 contra difteria y tétano no tuvo efectos adversos detectables en ratas hembras madres ni en los fetos o crías de la primera generación.

Como fue descripto previamente, en los últimos años se han desarrollado numerosas vacunas eficaces y seguras contra COVID-19. El SARS-CoV-2 utiliza su proteína (S) trimérica para unirse a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en las células huésped, lo que facilita la entrada y la infección viral. El receptor ACE2 se expresa de manera abundante en la placenta durante la gestación y puede aumentar la susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 en mujeres embarazadas, lactantes y en sus fetos^{23,65}. Sin embargo, se excluyen mujeres embarazadas y lactantes en los ensayos clínicos de evaluación de vacunas, debido a insuficiente evidencia toxicológica, y este hecho deriva en la falta de evidencia sobre una población de alto riesgo y su descendencia^{23,66}.

En la presente revisión son analizados y descriptos a continuación los principales trabajos basados en ensayos preclínicos de evaluación de toxicidad reproductiva y del desarrollo de vacunas para COVID-19, de los últimos años y están referenciados además en la Tabla 1. En relación a la aprobación de vacunas para COVID-19 en la Unión Europea, la EMA publica los Informes Públicos de Evaluación Europeas (EPAR) que se encuentran disponibles en: <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/how-we-work/transparency>.

Particularmente Dubé y col.⁶⁷, no encontraron efectos adversos del candidato vacunal CoVLP con adyuvante AS03 altamente inmunogénico en adultos sanos, en el desarrollo embrionario de ratas (incluida la teratogenicidad) ni en el desarrollo temprano de la primera descendencia, respaldando el perfil de seguridad aceptable de la vacuna para su administración en mujeres en edad fértil. Por su parte, Song y col.⁵⁹, evaluaron los efectos sobre la fertilidad en hembras, el de-

Tabla 1 | Resumen de evaluación de toxicidad reproductiva y del desarrollo mediante ensayos preclínicos en vacunas recientes para COVID-19

Vacuna	Estudio realizado	Especie	Cita	Año
SCTV01E	PPND	Ratas	(23)	2025
Advax-CpG55.2™	EFD- PPND	Ratones	(68)	2023
ZF2001	EFD- PPND	Ratas	(59)	2023
AS03-adjuvanted CoVLP	EFD	Ratas	(67)	2022
	PPND			
Ad26.COVS.2	EFD- PPND	Ratones	(70)	2021
BNT162b2 (Pfizer)	EFD- PPND	Ratas	(56)	2021
ChAdOx1 nCoV-19 (Astrazeneca)	EFD- PPND	Ratones	(55)	2021

PPND: desarrollo pre-postnatal (PPND: del inglés Pre and Pos Natal Development); EFD: desarrollo embriofetal (EFD: del inglés Embryo-Fetal Development)

sarrollo embriofetal y la toxicidad del desarrollo pre y posnatal asociados con el candidato vacunal ZF2001 para COVID-19 en ratas, respaldando también el inicio de ensayos clínicos y el uso de ZF2001 en mujeres embarazadas y lactantes.

Sakala y col.⁶⁸, evaluaron una vacuna contra las enfermedades COVID-19 e influenza junto con el adyuvante Advax-CpG55.2™, administradas individualmente o en conjunto, demostrando no causar efectos adversos sobre el rendimiento reproductivo en ratones hembras o en el desarrollo de sus crías, incluso con dosis entre 250 y 1000 veces superiores a las dosis habituales de la vacuna humana. Recientemente, Zhang y col.²³, evaluaron en ratas el candidato vacunal SCTV01E encontrando un perfil de seguridad favorable y una eficiente transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos. En este estudio no se observaron efectos adversos significativos sobre la fertilidad parental ni el desarrollo embriofetal.

Un estudio de revisión de Hernández y col.⁶⁹ resume y analiza los informes de evaluación de la EMA sobre la seguridad de las tres vacunas para COVID-19 utilizadas hasta el año 2021 (Pfizer, Moderna y AstraZeneca) sin encontrar efectos adversos sobre la fertilidad, el desempeño reproductivo, la gestación y el desarrollo posnatal. Posteriormente, Schilder y col.³⁹, también llevaron a cabo una revisión y análisis sobre los ensayos en toxicidad reproductiva y del desarrollo para vacunas para COVID-19⁷⁰. En este trabajo se analizaron los resultados de to-

xicidad de ocho vacunas que presentaron solicitud de autorización en Europa hasta el 2022 y que comprenden cuatro tecnologías de vacunas diferentes (vacunas inactivadas, basadas en ácidos nucleicos, vectores y subunidades). En estos estudios reportados se utilizaron mayormente ratas, ratones y conejos como animales de experimentación y se realizaron conforme a las guías internacionales antes mencionadas. Las observaciones que se informaron se remiten en su mayoría a reacciones en el sitio de inyección, siendo locales, leves y reversibles, atribuibles al adyuvante o a la administración intramuscular. Todas las vacunas evaluadas indujeron una respuesta inmune robusta en madres, con transferencia de inmunidad hacia las crías, comprobando la transferencia pasiva de anticuerpos y la protección de los neonatos³⁹. Finalmente, ninguno de los trabajos y revisiones analizadas comunicó efectos adversos de relevancia de vacunas sobre todo para COVID-19 sobre la fertilidad, el desempeño reproductivo, la gestación y el desarrollo pre y posnatal (Tabla 1).

Conclusiones

El propósito de la evaluación preclínica de seguridad de una vacuna es analizar la inocuidad tanto de los componentes incluidos en la formulación como de la respuesta inmune que esta provoca. Esto es de vital importancia, especialmente ante enfermedades emergentes, como fue el caso de COVID-19, y frente a la generación de nuevos compuestos derivados de los avances

en la industria farmacéutica. Los ensayos preclínicos en animales de laboratorio permiten obtener información precisa sobre los posibles efectos de una vacuna en un período de tiempo relativamente breve. En el caso de las vacunas preventivas, los estudios de toxicidad reproductiva suelen centrarse en el desarrollo pre y posnatal, con el objetivo principal de identificar posibles efectos adversos sobre el embrión, el feto o el recién nacido en desarrollo. Además, estas evaluaciones no solo deben considerar los posibles impactos sobre la fertilidad, la embriogénesis, el desarrollo y la reproducción, sino también contemplar las posibles interacciones entre la vacuna y el sistema inmunológico tanto materno como de la descendencia.

Esta revisión recopila información sobre los ensayos preclínicos de toxicidad reproductiva y del desarrollo realizados en animales de laboratorio para nuevas vacunas, especialmente aquellas dirigidas contra COVID-19. En su mayoría, las observaciones reportadas se limitan a reacciones locales, leves y reversibles en el sitio de inyección, asociadas al adyuvante o al método de administración. Todas las vacunas evaluadas generaron una respuesta inmune en las madres, con evidencia de transferencia pasiva de anticuerpos a las crías, con la consecuente protección de los neonatos. Ninguno de los estudios analizados reportó efectos adversos significativos sobre la fertilidad, la función reproductiva, la preñez o el desarrollo pre y posnatal.

Dado que las mujeres embarazadas y lactantes generalmente no son incluidas en los ensayos clínicos de vacunas por motivos éticos, debi-

do a la falta de evidencia toxicológica suficiente, persiste una brecha de conocimiento respecto a una población de alto riesgo y a su descendencia. En un programa de inmunización planificado, lo ideal es administrar la vacuna antes del embarazo, siempre que sea posible. Sin embargo, en el caso de vacunas que no pueden evitarse durante el embarazo, la lactancia o la niñez, como aquellas dirigidas a enfermedades infecciosas emergentes o reemergentes, resulta fundamental contar con estudios que brinden información sobre la seguridad tanto para madres y recién nacidos como para hombres y mujeres en edad fértil. Por lo tanto, es imprescindible disponer de datos provenientes de estudios preclínicos de toxicidad reproductiva y del desarrollo, antes de aprobar una vacuna, más aún, considerando que este tipo de ensayos brindan información confiable si se desarrollan bajo buenas prácticas de laboratorio. Estos ensayos contribuyen no solo a garantizar la seguridad de los candidatos vacunales antes de su evaluación clínica, sino también a respaldar decisiones regulatorias basadas en evidencia, promover el desarrollo ético de nuevas vacunas y reforzar la confianza pública en su uso.

Considerando el carácter global del desarrollo de vacunas, la coordinación en la realización de estudios preclínicos y clínicos representa una ventaja significativa, ya que permite optimizar recursos, acelerar los tiempos de desarrollo y garantizar resultados más robustos y comparables a nivel internacional.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Faqi AS. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, 2nd. ed. Elsevier Inc 2017; p 1-4.
2. Steinmetz KL, Spack EG. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurol* 2009; 9: S2..
3. Osakwe O. Preclinical In vitro studies : development and applicability. Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization. Elsevier Inc 2016; 129-48.
4. European Medicines Agency. ICH guideline M3 (R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals, 2009; 3.
5. Vita N. Descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Farm* 2023; 165: 9-17.
6. Roberts R, Jones D. Science-led regulatory strategies in nonclinical development of new medicines. *Toxicol Res* 2023; 12: 145-9.
7. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. *JAMA* 2020; 323:844-53.

8. Giráldez Dávila A, Zúñiga JM. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio, 1ª ed. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá, España. 2008; p 11-36.
9. World Health Organization. WHO guidelines on non clinical evaluation of vaccines. *WHO Technical Report Series* 2005; 927: 31-63. Annex1.
10. World Health Organization. Recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents. *Technical Report Series* 2002; 910: 99-102.
11. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. Disposición 705/2005. Especialidades Medicinales. 2005; p 0-2. En: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposicion-705-2005-103738>; consultado junio 2025.
12. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. Disposición 7075/2011. Especialidades medicinales. 2011. En: . <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposicion-7075-2011-188580/texto>; consultado junio 2025.
13. Acosta-Coley I, Cervantes-Ceballos L, Tejeda-Benítez L, et al. Vaccines platforms and COVID-19: what you need to know. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 2022; 8: 20.
14. Batista-Duharte A, Lindblad EB, Oviedo-Orta E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol Lett* 2011; 203: 97-105.
15. Wolf JJ, Plitnick LM, Herzyk DJ. Strategies for the nonclinical safety assessment of vaccines. *Novel Immune Potentiators and Delivery Technologies for Next Generation Vaccines* 2012; 323-49.
16. Verdier F. Non-clinical vaccine safety assessment. *Toxicology* 2002; 174: 37-43.
17. Guidance for Industry Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Res. 2013. En: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>; consultado junio 2025.
18. De Meyer A, Meuleman P. Preclinical animal models to evaluate therapeutic antiviral antibodies. *Antiviral Res* 2024; 225: 105843.
19. González-Domínguez I, Puente-Massaguer E, Abdeljawad A, et al. Preclinical evaluation of a universal inactivated influenza B vaccine based on the mosaic hemagglutinin-approach. *NPJ Vaccines* 2024; 9: 222.
20. Feng J, Du Y, Chen L, et al. A quadrivalent recombinant influenza hemagglutinin vaccine induced strong protective immune responses in animal models. *Vaccine* 2024; 42: 126008.
21. Hauguel T, Sharma A, Mastrocola E, et al. Preclinical immunogenicity and safety of hemagglutinin-encoding modRNA influenza vaccines. *NPJ Vaccines* 2024; 9: 183.
22. World Health Organization. Weekly operational update on COVID-19. En: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-update-on-covid-19---16-october-2020>; consultado junio 2025.
23. Zhang X, Jia J, Chen G, et al. Developmental and reproductive toxicity (DART) study of a novel SARS-CoV-2 tetravalent recombinant protein vaccine (SC-TV01E) in rats. *Reprod Toxicol* 2025; 134: 108878.
24. Sarkis M, Bernardi A, Shah N, Papatnasiou MM. Decision support tools for next-generation vaccines and advanced therapy medicinal products: present and future. *Curr Opin Chem Eng* 2019; 1: 100689.
25. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020; 586: 516-27.
26. Mykytyn AZ, Breugem TI, Riesebosch S, et al. SARS-CoV-2 entry into human airway organoids is serine protease-mediated and facilitated by the multibasic cleavage site. *Elife* 2021; 10: e64508.
27. Lutz C, Maher L, Lee C, Kang W. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Human Genomics* 2020; 14: 20.
28. McCray PB, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2007; 81: 813-21.
29. Netland J, Meyerholz DK, Moore S, Cassell M, Perlman S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* 2008; 82: 7264-75.
30. Berengeno AI, Matiller V, Díaz PU, et al. Generación de una colonia de ratones transgénicos homocigotas K18-hACE2 para la evaluación de candidatos vacunales y terapéuticos contra el SARS-CoV-2. *FAVE* 2021; 20: 31-9.
31. Kenneth HD, Leist SR, Schäfer A, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature* 2020; 586: 560-6.
32. Hoffmann D, Corleis B, Rauch S, et al. CVnCoV and CV2CoV protect human ACE2 transgenic mice from ancestral B BavPat1 and emerging B.1.351 SARS-CoV-2. *Nat Commun* 2021; 12: 4048.
33. Motamedi H, Mahdizade M, Dashtbin S, et al. An update review of globally reported SARS-CoV-2

- vaccines in preclinical and clinical stages. *Int Immunopharmacol* 2021; 96: 107763.
34. Organización Panamericana de la Salud. Preguntas frecuentes: vacunas contra covid 19. En: <https://www.paho.org/es/vacunas-contra-covid-19/preguntas-frecuentes-vacunas-contra-covid-19>; consultado junio 2025.
 35. López MV, Vinzón SE, Cafferata EGA, et al. A single of a hybrid hAdV5-based anti-COVID-19 vaccine induces a long-lasting immune response and broad coverage against VOC. *Vaccines* 2021; 9: 1106.
 36. Maruggi G, Mallett CP, Westerbeck JW, et al. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models. *Mol Ther* 2022; 30: 1897–912.
 37. Domingo JL. A review of the scientific literature on experimental toxicity studies of COVID - 19 vaccines, with special attention to publications in toxicology journals. *Arch Toxicol* 2024; 98: 3603–17.
 38. Hayashi H, Sun J, Yanagida Y, et al. Preclinical study of a DNA vaccine targeting SARS-CoV-2. *Curr Res Transl Med* 2022; 70: 103348.
 39. Schilder NKM, Tiesjema B, Theunissen PT, Rengerink KO, Van Der Laan JW. Evaluation of non-clinical toxicity studies of COVID-19 vaccines. *Regul Toxicol Pharmacol* 2023; 142: 105438.
 40. Modjarrad K, Che Y, Chen W, et al. Preclinical characterization of the Omicron XBB.1.5-adapted BNT162b2 COVID-19 vaccine. *NPJ Vaccines* 2024; 9: 229.
 41. Vinzón SE, Lopez MV, Cafferata EGA, et al. Cross-protection and cross-neutralization capacity of ancestral and VOC-matched SARS-CoV-2 adenoviral vector-based vaccines. *NPJ Vaccines* 2023;8: 149.
 42. Lu J, Tan S, Gu H, et al. Effectiveness of a broad-spectrum bivalent mRNA vaccine against SARS-CoV-2 variants in preclinical studies. *Emerg Microbes Infect* 2024; 13: 2321994.
 43. Dashti N, Golsaz-Shirazi F, Soltanghoraee H, et al. Preclinical assessment of a recombinant RBD-Fc fusion protein as SARS-CoV-2 candidate vaccine. *Eur J Microbiol Immunol* 2024; 14: 228–42.
 44. Muminov M, Tsiferova N, Pshenichnov E, et al. Development , pre-clinical safety, and immune Profile of RENOVAC - a dimer RBD-based anti-coronavirus Subunit Vaccine. *Vaccines* 2024; 12: 1420.
 45. Coria LM, Rodriguez JM, Demaria A, et al. A Gamma-adapted subunit vaccine induces broadly neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants and protects mice from infection. *Nat Commun* 2024; 15: 997.
 46. Pasquevich KA, Coria LM, Ceballos A, et al. Safety and immunogenicity of a SARS-CoV-2 gamma variant RBD-based protein adjuvanted vaccine used as booster in healthy adults. *Nat Commun* 2023;14: 4551.
 47. Perez Marc G, Coria LM, Ceballos A, et al. Immunogenicity and safety of monovalent and bivalent SARS-CoV-2 variant adapted RBD-based protein booster vaccines in adults previously immunized with different vaccine platforms: a phase II / III, randomized clinical trial. *Vaccine* 2025; 54: 127045.
 48. Psarris A, Sindos M, Daskalakis G, et al. Immunizations during pregnancy : how, when and why. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019; 240: 29–35.
 49. Garde V, Harper D, Fairchok MP. Tertiary contact vaccinia in a breastfeeding infant. *JAMA* 2004; 291: 725–7.
 50. Bohlke K, Galil K, Jackson LA, et al. Postpartum varicella vaccination : is the vaccine virus excreted in breast milk?. *Obstet Gynecol* 2003;102: 970–7.
 51. Verdier F, Barrow PC, Buerge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology* 2003; 185: 213–9.
 52. Wise LD, Pauley CJ, Michael B, Wolf JJ. Lack of effects on male fertility from a quadrivalent HPV vaccine in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2010; 89: 376-81.
 53. Marianno P, Salles MJS, Sonogo AB, et al. Gestational exposure to yellow fever vaccine at different developmental stages induces behavioral alterations in the progeny. *Neurotoxicol Teratol* 2013; 35: 21-7.
 54. Destexhe E, Stannard D, Wilby OK, et al. Nonclinical reproductive and developmental safety evaluation of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic, a therapeutic vaccine for cancer treatment. *Reprod Toxicol* 2015; 51: 90–105.
 55. Stebbings R, Maguire S, Armour G, et al. Developmental and reproductive safety of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) in mice. *Reprod Toxicol* 2021;104: 134–42.
 56. Bowman CJ, Bouressam M, Champion SN, et al. Lack of effects on female fertility and prenatal and postnatal offspring development in rats with BNT162b2, a mRNA-based COVID-19 vaccine. *Reprod Toxicol* 2021; 103: 28–35.
 57. FDA guidance for industry considerations for developmental therapeutic vaccines for infectious toxicity studies for preventive and disease indications. federal register. 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20978363>; consultado junio 2025.
 58. Plitnick LM. Global Regulatory Guidelines for Vaccines. In: *Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics*. 2013. 225–41.

59. Song Y, Shao J, She G, et al. Developmental and reproductive toxicity of a recombinant protein subunit COVID-19 vaccine (ZF2001) in rats. *NPJ Vaccines* 2023; 8: 74.
60. Barrow PC, Allais L. Developmental toxicity testing of vaccines. *Methods Mol Biol* 2013; 947: 81–9.
61. Lewis RW, Andrus AK, Arroyo J, et al. Considerations for the development of guidance on dose level selection for developmental and reproductive toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2024; 148: 105585.
62. Wise LD, Wolf JJ, Plitnick LM. Evaluation of a 9-valent HPV vaccine in sprague-dawley rats: nonclinical studies assessing general, reproductive, and developmental toxicity. *Vaccine* 2018; 36: 6401–7.
63. Stokes AH, Franklin K, Fisher DE, et al. Repeated dose toxicity study and developmental and reproductive toxicology studies of a respiratory syncytial virus candidate vaccine in rabbits and rats. *Int J Toxicol* 2021; 40: 125–42.
64. Lee JY, Lee JA, Lee HK, et al. Diphtheria-tetanus acellular pertussis combined vaccine has no effects on fertility and prenatal and postnatal development and toxicity in female sprague-dawley rats. *Reprod Toxicol* 2024; 126:108587.
65. Nobrega Cruz NA, Stoll D, Casarini DE, Bertagnolli M. Role of ACE2 in pregnancy and potential implications for COVID-19 susceptibility. *Clin Sci* 2021;135: 1805–24.
66. Garg I, Shekhar R, Sheikh AB, Pal S. COVID-19 vaccine in pregnant and lactating women : a review of existing evidence and practice guidelines. *Infect Dis Rep* 2021; 13: 685–99.
67. Dubé C, Paris-Robidas S, Primakova I, et al. Lack of effects on female fertility or pre- and postnatal development of offspring in rats after exposure to AS03-adjuvanted recombinant plant-derived virus-like particle vaccine candidate for COVID-19. *Reprod Toxicol* 2022; 107: 69–80.
68. Sakala IG, Honda-Okubo Y, Petrovsky N. Developmental and reproductive safety of Advax-CpG55. 2 TM adjuvanted COVID-19 and influenza vaccines in mice. *Vaccine* 2023; 41: 6093–104.
69. Hernández AF, Calina D, Poulas K, Docea AO, Tsatsakis AM. Safety of COVID-19 vaccines administered in the EU: should we be concerned? *Toxicol Rep* 2021; 8: 871–9.
70. Assessment report. COVID-19 Vaccine Janssen. EMA/158424/2021. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2021.