

Prueba toxicológica en ratones de una sola dosis inicial y segura de la vacuna cubana antileptospirosica Vax-SPIRAL

✉ Juan F Infante,¹ Sergio Sifontes,² Enrique Muñoz,¹ Martha González,¹ Viviana Pérez,¹ Carmen Baldor,¹ Mildrey Fariñas¹

¹Vicepresidencia de Investigaciones. Instituto Finlay. Calle 27, No. 19805, La Lisa. AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba

²Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Carretera de Camajuani, Km 5 1/2. Santa Clara, Villa Clara, Cuba

RESUMEN

Las evaluaciones toxicológicas de las vacunas son más rigurosas cada día y las pruebas de inocuidad específicas e inespecíficas no se consideran ya suficientes. La vacuna antileptospirosica Vax-SPIRAL para uso en humanos, está constituida por células inactivadas químicamente e hidróxido de aluminio como adyuvante. Los estudios preclínicos para evaluar el perfil de seguridad de las vacunas contra la leptospirosis, incluyen las pruebas de toxicidad de dosis única en una especie animal al menos. Para cumplir este requisito, se aplicó una dosis de Vax-SPIRAL o de cada componente de la vacuna a un total de 200 ratones OF1 (100 de cada sexo) por vía intramuscular o intraperitoneal, los cuales fueron observados durante 14 días. Se determinaron los incrementos de peso corporal y el promedio de consumo de agua y alimentos. Al finalizar el período experimental se realizaron estudios anatomopatológicos. No se encontraron síntomas clínicos de toxicidad y las diferencias entre las variables evaluadas no fueron significativas desde el punto de vista estadístico y/o biológico. Se observaron formaciones granulomatosas propias del adyuvante utilizado y las demás lesiones detectadas fueron incidentales. Los resultados evidenciaron una baja toxicidad de la vacuna Vax-SPIRAL.

Palabras claves: dosis única, leptospirosis, ratón, toxicología, vacuna, Vax-SPIRAL

Biotecnología Aplicada 2001;18:20-23

ABSTRACT

Toxicological Evaluation in Mice of an Initial Safe Single Dose for Vax-SPIRAL, a Cuban Vaccine against Leptospirosis. Toxicological tests on vaccines are increasingly exigent, and specific and non-specific safety tests are not considered sufficient any longer. Vax-SPIRAL is an inactivated whole-cell leptospiral vaccine adsorbed to aluminum hydroxide. The toxicity test by single dose in at least one animal species is included among the pre-clinical tests demanded to satisfactorily demonstrate the safety of vaccines against Leptospirosis. The aim of this work was to fulfill this requisite. A single dose of Vax-SPIRAL or of each component of the vaccine were inoculated to 200 OF1 mice (100 of each sex) by intramuscular or intraperitoneal routes. Mice were observed for 14 days, and body weight increases, water consumption and food intake were measured. Two weeks after inoculation all mice were sacrificed for anatomopathological examination. No clinical symptoms of toxicity were observed and differences between treatments were not biologically or statistically significant. Granulomatous processes typical of depot adjuvants, as well as incidental lesions, were found during macro- and microscopic examinations. The results demonstrated the low toxicity of a single dose of Vax-SPIRAL in mice.

Keywords: leptospirosis, mouse, single dose, toxicology, vaccine, Vax-SPIRAL

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad sistémica febril que afecta a los seres humanos y al resto de los vertebrados de sangre caliente. Está extendida por todo el mundo, aunque su mayor incidencia se produce en regiones tropicales y subtropicales [1]. La vacunación continúa siendo la mejor forma de control de la enfermedad y las vacunas de células inactivadas químicamente han sido muy utilizadas en varios países [2, 3]. En la actualidad, Cuba desarrolla una vacuna polivalente de células inactivadas químicamente adyuvada con hidróxido de aluminio, Vax-SPIRAL. Esta vacuna presenta ventajas en relación con otras vacunas como la procedente de la antigua URSS, en aspectos tan importantes como la reactogenicidad [4].

Las evaluaciones toxicológicas de las vacunas son más rigurosas cada día. Las determinaciones relacionadas con su seguridad potencial, incluyen estudios de toxicidad sistémica general, tolerancia local, pirogenidad, efectos inmunológicos adversos como la sensibilización, y, en algunos casos, estudios teratogénicos

y del sistema reproductor. Las pruebas preclínicas de toxicidad en dosis única y en dosis repetidas brindan una valiosa información sobre la seguridad del producto, al incluir el estudio macroscópico e histopatológico de órganos importantes, así como evaluaciones de las vías de administración y el régimen de dosificación [5]. La mayoría de las vacunas absorbidas emplean fosfato e hidróxido de aluminio como adyuvantes. Sin embargo, la cantidad de adyuvante requerida para obtener una eficacia adecuada es tan elevada en ocasiones, que los principales efectos adversos relacionados con la vacuna se pueden deber sólo al adyuvante. No obstante, se ha demostrado en general la seguridad de estos adyuvantes a partir de su extenso uso clínico y preclínico [5].

Este trabajo tuvo como objetivo hacer una evaluación toxicológica de la vacuna Vax-SPIRAL, tras su aplicación a ratones OF1 en dosis única a través de dos vías de administración diferentes.

1. Ratnam A. Pathogenesis and clinical signs. In: Ratnam A, editor. A manual on Leptospirosis Madras. CIUDAD: SR Publications; 1994. p.37-63.

2. Bex RF, Auran NE, Johnson RC. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamsters. Infect Immun 1974;10: 1051-6.

3. Fine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. No. 67. Geneva: World Health Organization Offset Publication; 1982. p.15-6.

4. Cruz de la Paz R, Rodríguez HP, López AC, Atienzar CE, Abreu UJ. Reactogenicidad de la vacuna antileptospirosica en Cuba. Rev Cub Hig Epid 1986;24:407-12.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 100 ratones OF1 de cada sexo. El peso corporal fue de 18-22 g y la edad estuvo comprendida entre 8 y 10 semanas. Estos animales fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba).

Se emplearon condiciones sanitarias convencionales y la temperatura y la humedad relativa se controlaron en el rango óptimo para esta especie [6]. Los ratones se alimentaron con el pienso correspondiente a esta especie y categoría, el cual fue suministrado por el CENPALAB con su certificado de calidad. El agua y el alimento se suministraron de forma controlada, pero en cantidades suficientes para permitir su ingestión *ad libitum*.

Para cada sexo se conformaron 10 grupos de 10 ratones cada uno: se inocularon 5 grupos por la vía intramuscular (IM) y los otros 5 por la vía intraperitoneal (IP). La distribución de los ratones en los grupos experimentales se realizó aleatoriamente y los grupos se hicieron corresponder con los tratamientos: 1) vacuna final Vax-SPiRAL, 2) adyuvante (hidróxido de aluminio 2 mg/mL), 3) Tiomersal (0,1 mg/mL), 4) tampón fosfato (PBS) y 5) ningún tratamiento (grupo control).

Las concentraciones de los productos a probar fueron equivalentes a las de la vacuna Vax-SPiRAL:

- Células de *Leptospira canicola* serovar *canicola*: $5-8 \times 10^7$
- Células de *L. icterohaemorrhagiae* serovar *copenhageni*: $5-8 \times 10^7$
- Células de *L. pomona* serovar *mozdok*: $5-8 \times 10^7$
- Hidróxido de aluminio: 1 mg
- Tiomersal: 0,05 mg
- PBS: cantidad suficiente para 0,5 mL

Se utilizó el lote No. 4001 de la vacuna Vax-SPiRAL. La vacuna y sus componentes se administraron en una sola dosis. El volumen aplicado en la extremidad posterior derecha (a nivel de los músculos cuádriceps femoral y semitendinoso) y en la zona ventral media del abdomen, fue el máximo permisible para cada una de las vías (vía IP: 0,5 mL; vía IM: 0,05 mL) [7].

Se pesaron los animales antes de la inoculación, a las 72 h y a los 14 días. La observación clínica se llevó a cabo dos veces al día, durante 14 días y a doble ciegos. El consumo de agua se registró diariamente durante los 14 días de observación. Cada día se colocó un frasco de 200 mL de agua acidulada (pH 2,5-2,8) y se determinó la diferencia entre la cantidad suministrada y el remanente luego de 24 h. Con estos datos se calculó el consumo promedio de agua por animal y se evaluó de forma similar el consumo de alimentos (cantidad inicial de alimento: 250 g).

Al décimocuarto día, los 200 animales fueron sacrificados por un método indoloro (sobredosis de pentobarbital sódico aplicada por vía IP, 200 mg/kg de peso vivo). Se llevó a cabo la observación macroscópica de todos los animales y se tomaron muestras de 20% de ellos (40 animales) para estudios histopatológicos.

De los animales inoculados por la vía IP, se tomaron muestras del sistema nervioso central (SNC), el páncreas, el corazón, el hígado, los riñones, el bazo, el peritoneo y los ganglios mesentéricos, y de los animales inoculados por la vía IM, muestras de estos mismos órganos y de tejidos del sitio de inoculación y de los ganglios linfáticos regionales. Los fragmentos se fijaron en formaldehído neutro 10%, se procesaron mediante la técnica de inclu-

sión en parafina, se cortaron en un micrótomos y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El protocolo de investigación se sometió a la evaluación de la comisión de ética institucional, la cual consideró adecuados los procedimientos de mantenimiento, ensayo y eutanasia.

Los incrementos de peso se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación triple (tratamiento x sexo x vía), y el consumo de agua y alimento, mediante ANOVA múltiple con mediciones repetidas (tratamiento x sexo x vía x semana). En los casos en que el ANOVA fue significativo, se aplicó la prueba de Duncan para determinar la diferencia entre medias. También se estudiaron las interacciones entre los tratamientos, los sexos y las vías de administración. La frecuencia de lesiones en los grupos tratados y los controles se comparó mediante la prueba de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos estadísticamente.

Resultados

Todos los ratones aumentaron su peso corporal durante las primeras 72 h posteriores a la administración de los productos. Cuando se analizaron todos los valores de incrementos de peso corporal mediante un ANOVA de clasificación triple (tratamiento x vía x sexo), no se observaron diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos ($p > 0,05$) en ninguno de los períodos estudiados (0-3, 3-14 y 0-14 días) (Figura 1). Durante los 14 días de observación posteriores a la inoculación, todos los grupos mostraron incrementos medios de peso corporal superiores a 5,5 g.

Los machos aumentaron de peso más que las hembras ($9,4 \pm 0,5$ g vs. $3,8 \pm 0,3$ g) ($p < 0,05$) y no se observaron diferencias entre las vías de administración. Tampoco existió una interacción significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos y el sexo o la vía de administración.

El consumo promedio de alimento fue similar ($p > 0,05$) en todos los grupos de tratamiento durante los 14 días del experimento (todas las medias oscilaron entre $5,1 \pm 0,5$ y $5,9 \pm 0,6$ g diarios por animal). Asimismo, el consumo de cada grupo fue superior ($p < 0,05$) en la primera semana comparado con la segunda (datos no mostrados). No se evidenciaron diferencias entre las vías de administración ($p < 0,01$) y los machos consumieron más que las hembras ($6,2 \pm 0,6$ g y $4,9 \pm 0,4$ g, respectivamente).

Ningún grupo tratado se diferenció estadísticamente de los controles ($p > 0,05$) en cuanto al consumo de agua. Sólo el grupo tratado con Tiomersal mostró un consumo ligeramente más bajo ($p < 0,05$), comparado con los grupos tratados con la vacuna y con PBS. No obstante, las diferencias fueron poco significativas desde el punto de vista biológico (0,3-0,5 g). El consumo de agua de los machos fue mayor que el de las hembras ($5,8 \pm 0,4$ vs. $4,9 \pm 0,3$ mL) ($p < 0,01$). No hubo interacción significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos y las vías de administración en relación con el consumo de agua (Figura 2).

En las observaciones clínicas realizadas dos veces al día, no se observaron síntomas que evidenciaran procesos patológicos, ni se registró la muerte de algún animal durante el ensayo. Solamente en los machos de los grupos inoculados con tiomersal se encontraron lesiones supurativas a nivel del escroto.

5. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on preclinical and toxicological testing of vaccines. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1997 (CPMP/SWP/465/95).

6. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 2. Ottawa, Ontario: EDITORIAL; 1980. p.84.

7. Norton S. Methods in behavioral toxicology. In: Wallace AH, editor. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press; 1982. p.353-75.

Entre los hallazgos anatomopatológicos, se observó degeneración vacuolar de los hepatocitos en 25% (2/8) de los ratones controles y en 31% (10/32) de los ratones pertenecientes a los demás grupos experimentales ($p = 0,37$). También se produjeron hemorragias focales en pulmón en 16% de los animales tratados y en 13% de los controles ($p = 0,41$). Estas lesiones se encontraron en ratones inoculados por ambas vías, tanto en los machos como en las hembras.

En los grupos en que se utilizó el adyuvante (vacuna y adyuvante), se observaron formaciones granulomatosas de tipo macrofágico a nivel del sitio de inoculación (vía IM) o diseminadas en la cavidad abdominal (vía IP). En la piel de los ratones machos tratados con Tiomersal, se observaron, microscópicamente, procesos granulomatosos y con absceso a nivel de la epidermis y del tejido subcutáneo.

Discusión

Por ser Vax-SPIRAL una vacuna de células completas inactivadas y adsorbida en hidróxido de aluminio, se previó una disminución inicial del peso teniendo en cuenta el aumento de la actividad metabólica que generan los procesos de desintoxicación con el consiguiente consumo de energía [8]. Sin embargo, todos los ratones tuvieron un aumento de peso similar en los tres intervalos analizados en este experimento, independientemente del tratamiento aplicado.

Los valores de aumento de peso para cada período estudiado, coinciden con los obtenidos en un ensayo similar en el que se evaluó la toxicidad de la vacuna antitifoidea VA-DIFTET en dosis única y en la misma especie [9].

Estos resultados concuerdan con los de la prueba de inocuidad general inespecífica realizada a varios lotes de Vax-SPIRAL, en el sentido de que todos los animales aumentaron su peso corporal y no se observó ningún síntoma de toxicidad [10]. Asimismo, estos hallazgos coinciden con los resultados de otras pruebas toxicológicas a que ha sido sometida esta vacuna [11].

El comportamiento de la variable "consumo de alimentos" constituye otra evidencia de la baja toxicidad de las sustancias evaluadas. Normalmente, durante los primeros días, la presencia de sustancias tóxicas provoca una disminución en el consumo de alimentos en los animales. Luego, este consumo tiende a aumentar para compensar la pérdida inicial y evitar el desgaste tisular [9]. Estos eventos no se detectaron en el ensayo y se obtuvo un efecto similar por las dos vías de administración utilizadas, cuando, por razones de biodisponibilidad y dosis, se esperaba una respuesta más marcada por la vía IP.

El hecho de que la ganancia de peso vivo y el consumo de agua y alimentos hayan sido mayores en los machos que en las hembras, puede obedecer a diferencias fisiológicas entre los dos sexos. De la misma forma, es lógico que haya habido mayor consumo de agua y alimentos en los animales durante la segunda semana del experimento en virtud de su mayor peso, lo cual incrementa el consumo básico o de mantenimiento.

La ausencia de interacciones entre los tratamientos y el sexo, y entre los tratamientos y la vía, puede sugerir: 1) una baja toxicidad de los productos probados, teniendo en cuenta que dosis mayores y la administración por una vía que ofrece mayor biodisponibilidad (IP) mostraron efectos

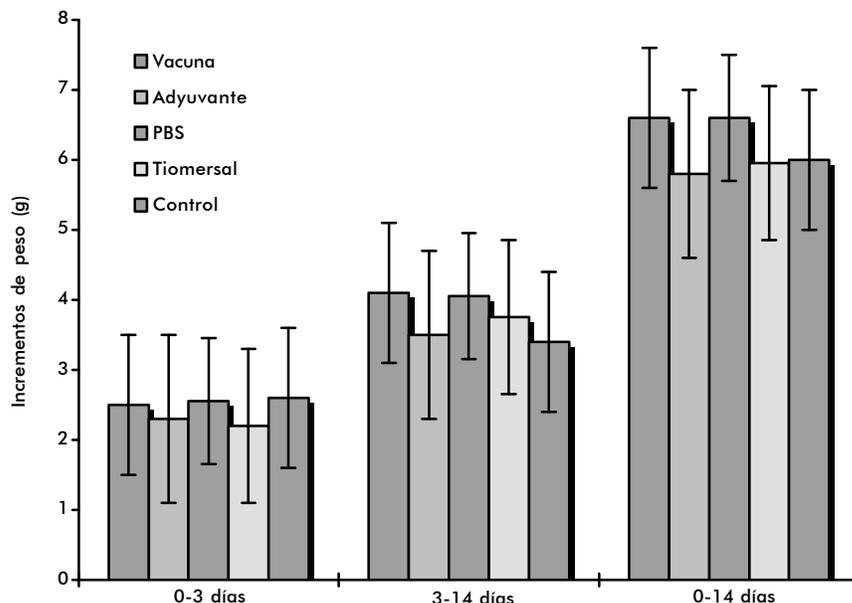


Figura 1. Medias generales (incluyen ambos sexos y vías) de los incrementos de peso corporal en los ratones. No existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales en ninguno de los períodos estudiados.

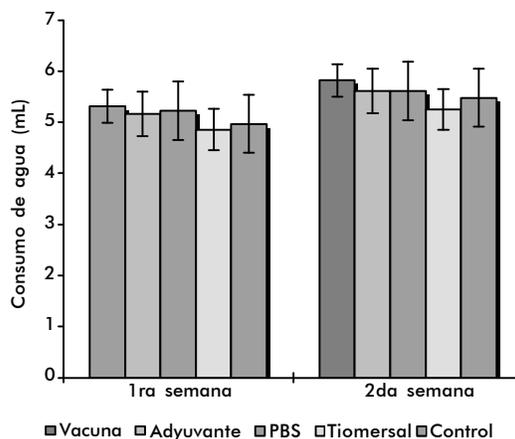


Figura 2. Consumo de agua promedio durante la primera y segunda semanas posteriores a la administración de los productos. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los controles y los grupos tratados. Durante la segunda semana todos los grupos consumen más que en la primera ($p < 0,01$).

similares a los de su contraparte; 2) poco compromiso de la función hepática en los procesos de desintoxicación del organismo de dichos productos, considerando que no se evidenciaron diferencias entre una vía que permite el metabolismo de primer paso en el hígado, y otra que permite que el producto se distribuya sistémicamente y luego llegue al hígado; y 3) similitud entre los mecanismos de desintoxicación del organismo de estos productos en los machos y las hembras.

Las observaciones clínicas no mostraron síntomas que evidenciaron trastornos patológicos, mucho menos aquellos descritos para la leptospirosis en otras especies de animales de laboratorio [12-14].

Desde el punto de vista anatomopatológico, los procesos congestivos y hemorrágicos encontrados se ob-

8. Sotolongo M. Elementos de toxicología. La Habana: Pueblo y Educación; 1988. p.27-31.

9. Infante JF, Sifontes S, Pérez RP, González RP, Muñoz CE, Marrero ChO. Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. Rev Esp Toxicol 1998;15: 61-5.

10. González GM, Estévez ML, Hidalgo GC, González NI, Yí CR, Infante JF, et al. Vax-SPIRAL, vacuna antileptospirosis trivalente (canicola, copenhageni, mozdok) para uso humano. Certificado de Inscripción No. 1050, CEDMED, República de Cuba, Ministerio de Salud Pública; 1998. ERM:846/98.

servan con frecuencia al aplicar una sobredosis de anestésicos barbitúricos, puesto que estas sustancias producen paro cardíaco y respiratorio [15]. La degeneración vacuolar a nivel de los hepatocitos pudiera estar relacionada con el alto contenido energético de la dieta [16], sobre todo si se considera que estas lesiones aparecieron tanto en los grupos experimentales como en los controles.

Los procesos granulomatosos de tipo macrofágico que se observaron en el punto de inoculación para la vía IM y diseminados en la cavidad abdominal para la vía IP, coinciden con los hallazgos descritos en el caso de adyuvantes de depósito como el hidróxido de alumi-

nio y que desempeñan un papel importante en el desarrollo y la duración de la respuesta inmunitaria [17-21].

Las lesiones cutáneas que se observaron en algunos animales machos, pudieran estar relacionadas con traumas ocasionados por las peleas frecuentes que se producen entre los ratones, las cuales se infectaron luego con gérmenes piógenos. Estas lesiones no parecen tener relación con los productos empleados en el ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados de las investigaciones realizadas, se puede concluir que la vacuna Vax-SPIRAL fue satisfactoria en la prueba toxicológica de dosis única aplicada a ratones por dos vías de administración.

11. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, et al. Vacuna antileptospirosica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactividad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacciMonitor* 1997;12:2-10.

12. Oliva R, Infante JF, González M. Comparación clínico-patológica de la leptospirosis en hámster sirio o dorado y el curiel Duncan-Hartley mediante la infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. *VacciMonitor* 1998; 5:8-14.

13. Oliva R, Infante JF, González M. Pathological-clinical characterization of Leptospirosis in golden syrian hamster. *Arch Med Res* 1994;25(2):165-70.

14. Infante JF, Sifontes S, Sierra G, Campa C, Fariñas M. Los biomodelos aplicados al desarrollo de vacunas y sueros en el Instituto Finlay. *Animales de Experimentación* 1998;3(3):16-23.

15. Close B, Banister B, Baumans K, Bernoth V, Bromage EM, Bunyan N, et al. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación, Parte 1. *Lab Animals* 1997;31:1-32.

16. Atmore H, Carlyle T. Patología veterinaria. La Habana: Edición Revolucionaria, Instituto del Libro; 1968. p.27-8.

17. Infante JF, Muñoz E, Medina R, Oliva R. Inocuidad inespecífica realizada al b (1-3) glucano (Evimunk) de fabricación cubana.

Rev Salud Animal 1995;17:45-54.

18. Organización Mundial de la Salud. Coadyuvantes inmunológicos (Serie de Informes Técnicos, No. 595); 1976. p.10-3.

19. Thein P. Coadyuvantes, inmunomodulación e inmunestimulación. *Not Med Vet* 1988;59:3-7.

20. Vanselow B. The Application of adjuvants to veterinary medicine. *Vet Bull* 1987;57: 881-96.

21. Infante JF, Sierra G, Campa C, Capó V. Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones vacunados con VA-MENGOC-BC por vía intramuscular. *VacciMonitor* 1997;9:10-4.

Recibido en junio de 1999. Aprobado en octubre del 2000.