

Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL® en ratas Sprague Dawley

Juan F. Infante, Sergio Sifontes, Eduardo Alvarez, Martha González, Viviana Pérez, Eligio Sosa, Mildrey Fariñas, Juan F. Núñez, Tamara Hernández, Vismark Torres.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba. E-mail: jinfante@finlay.edu.cu

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. Cuba desarrolló una vacuna polivalente de células inactivadas químicamente adyuvadas con hidróxido de aluminio, vax-SPIRAL®. Esta vacuna presenta ventajas en relación con otras vacunas como la procedente de la antigua URSS. El esquema de vacunación para humanos consiste en dos dosis de 0,5 mL, separadas por un intervalo óptimo de seis semanas. El objetivo de este estudio de toxicidad en ratas Sprague Dawley fue determinar la toxicidad potencial, letalidad, órganos y sistemas susceptibles y otros eventos adversos, así como la toxicidad en el sitio de inoculación después de la administración de una dosis de la vacuna en estudio. Los resultados indicaron que, bajo las condiciones en estudio y según los criterios establecidos para evaluar los datos obtenidos, la vacuna antileptospirósica trivalente no produce efectos tóxicos en el modelo animal usado. Las únicas alteraciones encontradas fueron formaciones granulomatosas a nivel del sitio de inoculación. Estas formaciones han sido reportadas como pertenecientes al adyuvante de depósito (hidróxido de aluminio), también usado en otras vacunas de aplicación parenteral.

Palabras Claves: Dosis única, Leptospirosis, Rata, Toxicología, Vacuna, vax-SPIRAL®

Introducción

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica caracterizada por un cuadro clínico febril, agudo, causada por serovares patógenos de *Leptospira interrogans* (1). Los serovares más comúnmente asociados con esta enfermedad en el momento de iniciarse los estudios encaminados a la producción de la vacuna cubana a partir de cepas autóctonas eran *canicola*, *copenhageni* y *mozdok* (2).

Los estudios de toxicidad constituyen hoy en día una parte importante dentro del desarrollo de las nuevas vacunas. El objetivo de los mismos es evaluar el riesgo potencial contra la salud humana (3). Las pruebas preclínicas de toxicidad por dosis única y por 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 (4).

Cuba desarrolló una vacuna polivalente de células inactivadas químicamente y adyuvada con

hidróxido de aluminio, vax-SPIRAL®. Esta vacuna presenta ventajas en relación con otras vacunas como la procedente de la antigua URSS (5). El esquema de inmunización para humanos consta de dos dosis de 0,5 mL con un intervalo de 5 a 6 semanas. La segunda dosis es imprescindible para lograr la protección y se recomiendan reactivaciones anuales para mantener los niveles adecuados de anticuerpos.

Los objetivos de este estudio evaluativo de toxicidad por dosis única y tolerancia local en ratas Sprague Dawley (SD) son determinar la posible letalidad causada por la administración de una dosis de la sustancia de ensayo, los posibles signos tóxicos después de su aplicación, enfatizando además en el sitio de inoculación, así como los órganos y sistemas susceptibles a esta toxicidad potencial.

Materiales y Métodos

Para este estudio se utilizaron ratas SD de ambos sexos, de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal de 150 a 200 g que fueron suministradas por el Centro Nacional para la

Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Los animales fueron mantenidos en condiciones sanitarias convencionales y la temperatura y humedad relativa fueron controladas en el rango óptimo para esta especie (6). Las ratas fueron ubicadas de acuerdo con el sexo en cajas T- IV de policarbonato (superficie de 1800 cm²) a razón de 5 ratas por caja. El material que se usó como cama fue bagacillo de caña de azúcar suministrado por CENPALAB, previamente esterilizado y cambiado en días alternos. Los animales recibieron pienso para roedores, suministrado y certificado por CENPALAB, y agua fresca "ad libitum". Durante siete días antes del comienzo del experimento se estableció un período de adaptación, durante el cual fueron registrados los datos del peso corporal.

La vacuna antileptospirósica trivalente de uso humano (vax-SPIRAL®) contiene una suspensión de células enteras de *Leptospira interrogans*, pertenecientes a los serogrupos *canicola serovar canicola*, *icterohaemorrhagiae serovar copenhageni* y *pomona serovar mozdok*.

El lote de vacuna experimental cumplió con los requisitos establecidos por el CECMED. La sustancia en ensayo fue debidamente almacenada

a la temperatura de 2-8 °C y se mantuvo protegida de la luz. Previo a la aplicación, las muestras fueron atemperadas y homogenizadas. Para su administración se usaron jeringuillas de 1 mL y agujas hipodérmicas 23Gx1".

Conociendo la composición farmacéutica de esta vacuna (50-80 x 10⁶ células de cada serovar por 0,5 mL), se realizó un diseño experimental que permitiera la evaluación del riesgo derivado de la administración única de la sustancia, utilizando dos vías: la intramuscular (IM) en la cara interna del muslo izquierdo y la intraperitoneal (IP) a la derecha de la línea alba, zona media del abdomen (Tabla 1).

Como control del producto se aplicó un placebo consistente en:

Hidróxido de Aluminio	1 mg
Tiomersal	0,05 mg
PBS (Tampón fosfato salino)	0,5 mL
c.s.p	

La especie utilizada para el estudio admite en el músculo un volumen máximo de 0,3 mL y para la vía intraperitoneal hasta 3 mL. Esto permitió inocular por esta última vía hasta 0,5 mL que constituye la dosis propuesta para humanos (7).

Tabla 1. Diseño Experimental

Grupo	Tratamiento	Animales por sexo	Vía de administración	Volumen de dosis a aplicar
Grupo I	Células del serogrupo <i>canicola serovar canicola</i> + PBS	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo II	Células del serogrupo <i>icterohaemorrhagiae serovar copenhageni</i> + PBS	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo III	Células del serogrupo <i>pomona serovar mozdok</i> + PBS	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo IV	Células del serogrupo <i>canicola serovar canicola</i> + Células del serogrupo <i>icterohaemorrhagiae serovar copenhageni</i> + Células del serogrupo <i>pomona serovar mozdok</i> + PBS	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo V	Placebo	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo VI	vax-SPIRAL®	5 H y 5 M	IM	0,3 mL
		5 H y 5 M	IP	0,5 mL
Grupo VII	Control no inoculado	5 H y 5 M		

Diariamente se realizaron observaciones clínicas de los animales, además se controló el peso vivo cada 7 días, y el consumo de agua y alimentos en días alternos.

El estudio anatomopatológico se realizó a los 21 días del inicio del experimento, luego de la eutanasia de todos los animales (pentobarbital sódico 100 mg/kg IP). Se realizaron observaciones macroscópicas de todos los órganos y se tomaron muestras para estudios histopatológicos de las lesiones encontradas. Las mismas fueron fijadas en una solución de formalina tamponada al 10%, procesadas por técnicas de inclusión en parafina y cortadas en secciones con un grosor de 4 a 6 micrones, siendo teñidas con hematoxilina / eosina. La dirección y el número de secciones fueron hechas según las recomendaciones de la OECD para la evaluación de productos tóxicos (8).

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.

Para el análisis estadístico se aplicó un análisis de varianza triple (tratamiento x sexo x vía). Los

valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos estadísticamente.

Resultados y Discusión

Al analizar los resultados de la evaluación de la toxicidad por dosis única y la tolerancia local de la vacuna vax-SPiRAL® en ratas SD se determinó que el incremento de peso corporal no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los diferentes grupos de tratamientos en ninguno de los períodos evaluados. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las vías de administración. Los machos mostraron un incremento de peso superior al de las hembras ($P < 0,01$); no obstante, no hubo una interacción significativa ($P > 0,05$) entre el sexo y el tratamiento (Figuras 1–4). Estos resultados concuerdan con los de la prueba de inocuidad general inespecífica realizados a varios lotes vax-SPiRAL®, en la cual todos los animales aumentaron de peso corporal y no se observó ningún síntoma de toxicidad (9). Asimismo, estos hallazgos coinciden con los resultados de otras pruebas toxicológicas a que ha sido sometida esta vacuna (10).

Figura 1. Peso Corporal. Dosis única vía intramuscular.
Sexo Hembra

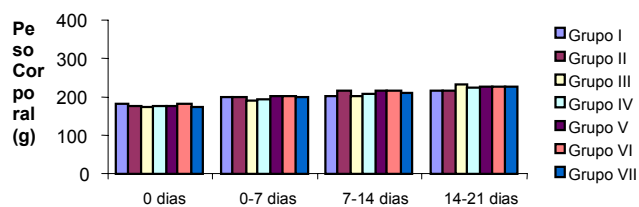
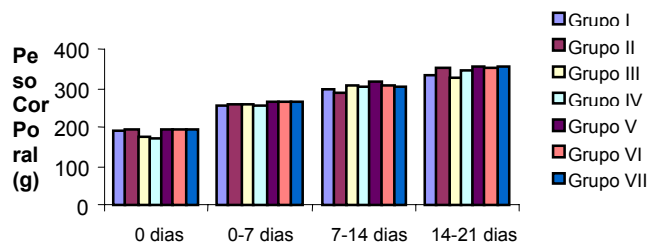


Figura 2. Peso Corporal. Dosis Única Vía Intramuscular.
Sexo Macho



Las observaciones clínicas no evidenciaron alteraciones en ninguno de los animales utilizados en el estudio. No se presentaron signos locales de inflamación que evidenciaran reacciones adversas en el sitio de inoculación. Por otra parte, la vía IP que por ser más agresiva por las características de la zona y por los volúmenes utilizados, tampoco evidenció signos clínicos, mucho menos aquellos descritos para la Leptospirosis (11,12).

En las necropsias realizadas no se encontraron cambios macroscópicos en órganos y tejidos. Los estudios histológicos no mostraron alteraciones que pudieran ser atribuibles a procesos tóxicos.

Figura 3. Peso Corporal. Dosis Unica. Vía intraperitoneal.

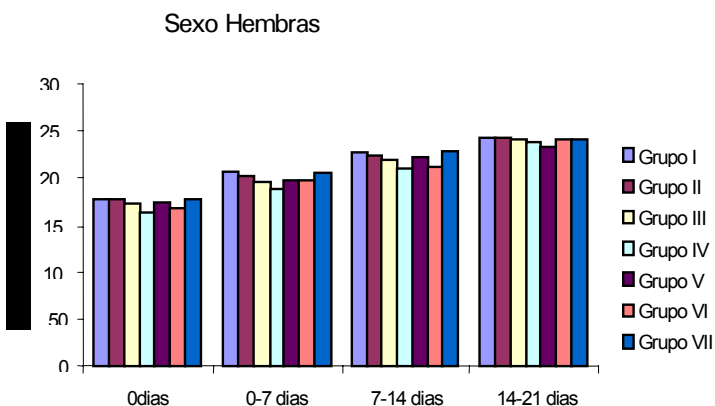
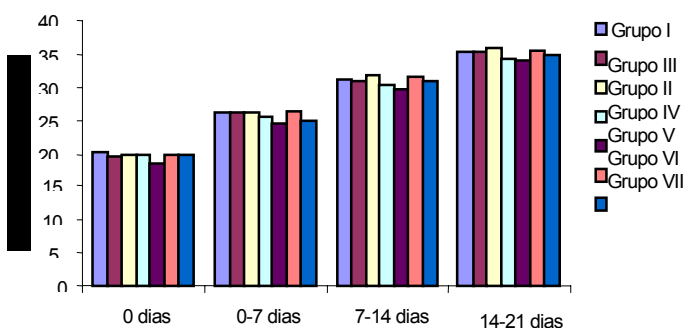


Figura 4. Peso Corporal Dosis Unica. Vía intraperitoneal. Sexo Macho



En los animales inoculados por la vía intramuscular se observaron formaciones granulomatosas de tipo macrófago a nivel del

músculo donde se practicó la inoculación (Tabla 2) en cuatro hembras del grupo V (placebo) y en dos del grupo VI (vacuna experimental). Por otra parte, con relación a los machos, estas mismas formaciones se presentaron también en el sitio de inoculación en un animal del grupo V (placebo).

Con respecto a la vía IP se observaron formaciones granulomatosas de tipo macrófago diseminadas en el peritoneo en cuatro hembras y cuatro machos del grupo V (placebo), así como en tres hembras y cuatro machos del grupo VI (vacuna experimental).

Estos procesos granulomatosos de tipo macrófago han sido descritos en estudios toxicológicos realizados a otras vacunas que contienen adyuvantes de depósito como el hidróxido de aluminio, el cual desempeña un papel importante en el desarrollo y duración de la respuesta inmune (13-17).

Tabla 2. Dosis Unica. Vía intraperitoneal e intramuscular, machos y hembras. Lesiones anatomopatológicas (%) por grupos.

Grupos de Tratamientos	Hembras		Machos	
	Vía		Vía	
	IP	IM	IP	IM
Grupo I				
Grupo II	-	2	-	-
Grupo III	-	-	-	-
Grupo IV	-	-	-	-
Grupo V	4	4	4	1
Grupo VI	3	2	4	-
Grupo VII	-	-	-	-

En algunos animales que presentaron este tipo de proceso se observaron, en el ganglio linfático regional correspondiente al sitio de inoculación, abundantes células plasmáticas al nivel de los senos linfáticos cercanos a la zona del hilio, lo cual pudiera formar parte del proceso inmunológico desencadenado por la inoculación realizada (18,19).

Teniendo en cuenta los resultados de las investigaciones realizadas podemos concluir que la vacuna vax-SPIRAL® cumple con los requisitos toxicológicos establecidos en el ensayo de dosis única conducido en la especie rata, utilizando las vías de inoculación intramuscular e intraperitoneal.

Referencias

- Midwinter A, Famine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immunoconjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microb*. 1990; 33:199-204.
- Martínez R, Cruz de la Paz R, López C. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la Leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cub Med Trop*. 1993;45(1):32-41.
- González, R 1996. Principios de Toxicología. España. [en línea]. Octubre 2002. Disponible en: <http://www.iqs.es/cbasicas/farma/farm05/tox/tox01.htm>[Consulta: enero 7 04].
- 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).
- Cruz de la Paz R, Rodríguez HP, López AC, Atienzar CE, Abreu UJ. Reactogenicidad de la vacuna antileptospirósica en Cuba. *Rev Cub Hig Epid* .1986; 24:407-12.
- Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol 2. Ottawa, Ontario: Editorial; 1980: 84.
- Norton S. Methods in behavioral toxicology. In: Wallace AH editor. Principles and Methods of Toxicology. New York: Raven Press; 1982, 353-75.
- OECD Guidelines for testing of chemical. Vol 1 and 2. Organization for economic cooperation and development. Prot 407. París, 1993.
- González GM, Estévez ML, Hidalgo GC, González NI, Yi CR, Infante JF, *et al*. Vax-SPIRAL®, vacuna antileptospirosis trivalente (canicola, copenhageni, mozdok) para uso humano. Certificado de Inscripción No.1050, CECMED, República de Cuba. Ministerio de Salud Pública; 1998. ERM: 846/98.
- González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R, Batista N, *et al*. Vacuna antileptospirósica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de Reactogenicidad e Inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. *VacciMonitor* 1997; 5:8-14.
- Oliva R, Infante JF, González M. Comparación clínico-patológica de la Leptospirosis en hámster sirio dorado y el Curiel Duncan Hartley mediante la infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. *VacciMonitor*. 1998; 5:8-14.
- Infante JF, Sifontes RS, Sierra G, Campas C, Fariñas M. Los biomodelos aplicados al desarrollo de vacunas y sueros en el Instituto Finlay. *Animales de Experimentación* 1998; 3(3):16-23.
- Infante JF, Muñoz E, Medina R, Oliva R. Inocuidad inespecífica realizada al β (1-3) glucano (Evimunk) de fabricación cubana. *Rev Salud Animal*. 1995;17:45-54.
- Organización Mundial de la Salud. Coadyuvantes Inmunológicos (serie de Informes Técnicos, No 595); 1976: 10-3.
- Thein P. Coadyuvantes, inmunomodulación e inmuoestimulación. *Not Med Vet* 1998; 59:3-7.
- Vanselow B. The Application of adjuvants to veterinary medicine. *Vet Bull*. 1987; 57:88-96.
- Infante JF, Sierra G, Campa C, Capo V. Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones vacunados con VA-MENGOC-BC® por vía intramuscular. *VacciMonitor*.1997;9:10-4.
- Dawson J, Rodorf GC, Towin T, Zingel HO, Chaplin D. Interleukin 1 (IL1) production in a mouse tissue chamber model of

inflammation. Identification of (tissue) macrophages as the IL-1 producing cells and the effect of antiinflammatory drugs. *Agents Action* 1993; 38(3-4): 255-64.

19. Luster MI *et al.* Development of testing battery to assesses chemical-induced immunotoxicity. *Fund Appl Toxicol.* 1988; (10):2-19.

Single dose toxicity and local tolerance evaluation of the vax-SPIRAL® vaccine in Sprague Dawley rats

Abstract

The pre-clinical toxicity tests in single dose and repeated doses give valuable information on the safety of the product, since they include the pathological and histopathological study of important organs, as well as the evaluation of the administration route and the dosage regime. At present, Cuba is developing a polyvalent vaccine (vax-SPIRAL®) from chemically inactivated cells, with an aluminium hydroxide adjuvant. This vaccine has advantages vis a vis other vaccines, as for example, the vaccine from the former Soviet Union. The vaccination schedule for humans consists in two doses of 0.5 mL, separated by an optimal interval of six weeks. The objective of this toxicity study in Sprague Dawley rats was to determine the potential toxicity, lethality, susceptible organs and other adverse events, as well as toxicity in the inoculation site after administering one dose of the vaccine under study. The results indicated that, under the conditions of the study and according to the established criteria for evaluating the data obtained, the antileptospirosis trivalent vaccine dose did not produce toxic effects in the animal model used. The only alterations found were granuloma formations at the inoculation site. These formations have been reported as belonging to the deposit adjuvant (aluminum hydroxide), also used in the other parenteral vaccines.

Keywords: Leptospirosis, Rat, Single Dose, Toxicology, Vaccine, vax-SPIRAL®