

Centro Nacional de Toxicología

***EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LA VACUNA
ANTILEPTOSPIRÓSICA VAX-SPIRAL EMPLEANDO EL ENSAYO
DE MICRONÚCLEOS TRASPLACENTARIOS***

Lic. Joaquina R. Fraga Álvarez,¹ Lic. Yordanka Domínguez Linares,² Lic. Marcia Friman Pérez,³ Lic. Susana B. González Hervis,³ Lic. Antonio D. Somoza Rodríguez³ y Téc. Cristina Pérez Rodríguez⁴

RESUMEN: El ensayo de micronúcleos trasplacentario, ha sido desarrollado con el objetivo de evaluar el potencial genotóxico en la descendencia y demostrar la capacidad de un agente de causar daños cromosómicos durante el período prenatal. Éste realiza el registro de aberraciones cromosómicas, demostrando si una sustancia determinada puede ser clastogénica o aneugénica en el feto, a través de la exposición materna. En el presente trabajo se evalúa, mediante este método, el potencial genotóxico de la vacuna antileptospirosica cubana vax-Spiral desarrollada por el Instituto Finlay, y destinada a la inmunización de los grupos de riesgo donde pueden estar incluidas las gestantes. La vacuna vax-Spiral y el placebo no mostraron efectos clastogénicos para ninguna de las dosis evaluadas a través de este ensayo, bajo nuestras condiciones experimentales.

DeCS: VACUNAS/aislamiento & purificación; LEPTOSPIROSIS; EMBARAZO; TESTS DE MICRONUCLEOS/métodos; TESTS DE MUTAGENICIDAD/métodos.

Desde el siglo XIX se comienza a tener conocimiento sobre la leptospirosis y es precisamente en el año 1886 que *Adolfo Weil*, en Alemania, describe por primera vez esta enfermedad en humanos.¹

En 1978 se inician las investigaciones sobre esta enfermedad en el Laboratorio del Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología para su diagnóstico,² y a

partir del año 1981 el Ministerio de Salud Pública, conjuntamente con el Ministerio de la Agricultura y el Instituto Nacional de Medicina Veterinaria, ponen en ejecución en nuestro país el Primer Programa de Prevención y Control de la Leptospirosis, con el propósito fundamental de controlarla y prevenirla tanto en el hombre como en los animales.³

¹ Licenciada en Biología. Investigadora Agregada.

² Licenciada en Ciencias Farmacéutica. Aspirante a Investigadora.

³ Licenciados en Ciencias Farmacéutica.

⁴ Técnica en Procesos Biológicos.

El hombre constituye un huésped ocasional de leptospiras y adquiere la enfermedad por contacto con productos patológicos de animales infectados o por el contacto con el agua, el suelo y los alimentos, contaminados con la orina de animales enfermos y portadores en fase de *leptospiruria*.^{4,5}

Los programas de inmunización antileptospirósica en el país se iniciaron hace algunos años con una vacuna soviética, con el inconveniente de que en su confección no se emplearon cepas autóctonas. Actualmente se está desarrollando la evaluación de la vacuna cubana producida por el Instituto Finlay a partir de cepas aisladas en nuestro país, con resultados alentadores para la protección de los grupos de alto riesgo, donde pueden estar incluidas las embarazadas, por lo que es necesaria la evaluación tóxico-reproductiva de esta vacuna.

El ensayo de micronúcleos trasplacentarios es empleado para evaluar la capacidad de un agente de causar daños cromosómicos durante el período prenatal, como resultado de la exposición de la madre a un agente.⁵ En este estudio, este será el ensayo utilizado con el objetivo de evaluar el efecto genotóxico, tanto en la madre como en el feto, que puede provocar la administración de la vacuna antileptospirósica cubana vax-Spiral durante el período gestacional.

Métodos

Se realizaron dos ensayos: el de micronúcleos en médula ósea materna y el de micronúcleos trasplacentarios en hígado fetal. Se trabajó con ratones de la línea NMRI vírgenes, de 9 a 13 sem de edad y fértiles, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, y con un peso entre 20 y 30 g. Estos se man-

tuvieron en adaptación durante 2 sem., bajo condiciones ambientales controladas, como se muestra a continuación:

Temperatura -21 ± 2 °C
 Humedad -50-70 %
 Iluminación -12 horas luz
 Alimentación y agua a voluntad.

Pasado este tiempo fueron sometidos al esquema de apareo y aquellas hembras en las que se constató la presencia del tapón espermático al día siguiente del apareo, se les consideró este como el día cero de la preñez. Éstas fueron marcadas y aleatorizadas para constituir los 5 grupos experimentales, con 3 hembras preñadas cada uno, como se muestra en la tabla 1.

La vía de administración empleada fue la intraperitoneal. Se realizaron administraciones los días 14, 15 y 16 de la gestación y 24 h después de la última inoculación se procedió al sacrificio de las gestantes por dislocación cervical y se obtuvieron las muestras de médula ósea materna e hígado fetal.

El registro de aberraciones se realizó a través del conteo de eritrocitos policromáticos con presencia de micronúcleos hasta 2 000 eritrocitos policromáticos por madre y 1 000 por feto (VPCE Mn/PCE totales).

El índice de citotoxicidad se determinó mediante la evaluación de la relación entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos (PCE/NCE), en 2 000 células contadas.

En el procesamiento estadístico se utilizó el programa *Tonystat*. Debido a que los datos experimentales no seguían una distribución normal ni eran sensibles a ninguna de las transformaciones de escala conocidas, se le aplicó el programa estadístico no paramétrico *Kruskall Wallis* y se verificaron los resultados a través del *test de Student Newman Keuls*, donde se utilizó para todos los casos una probabilidad menor de 0,05.

Resultados

Las siguientes tablas muestran los resultados de citotoxicidad materna y genotoxicidad materna y fetal, de la vacuna vax-Spiral, evaluada en ratones de la línea NMRI, cuya edad oscila entre 9 y 13 sem.

Discusión

El incremento de la presencia de células micronucleadas refleja el daño genotóxico causado por agentes que producen daño cromosómico o no disyunción.

Las dosis utilizadas de la vacuna vax-Spiral (0,5 y 1,0 ml) y de placebo

TABLA 1.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Sustancia	Ciclofosfamida	Agua destilada	Vacuna	Vacuna	Placebo
Dosis	40 mg/kg	1,0 mL	0,5 mL	1,0 mL	1,0 mL

TABLA 2. Comportamiento de la genotoxicidad materna entre los grupos de trabajo

Grupo	Sustancia	Dosis	% (PCE-NCE)±DS
1	Ciclofosfamida	20 mg/kg	2,0±0,01***
2	Agua destilada	1,0 mL	0,16±0,04 ns
3	Vacuna	0,5 mL	0,16±0,04 ns
4	Vacuna	1,0 mL	0,10±0,03 ns
5	Placebo	1,0 mL	0,18±0,04 ns

TABLA 3. Comportamiento de la genotoxicidad fetal entre los grupos de trabajo

Grupo	Sustancia	Dosis	% (PCE - NCE) ± DS
1	Ciclofosfamida	20 mg/kg	5,11±0,23 ***
2	Agua destilada	1,0 mL	0,35±0,05 ns
3	Vacuna	0,5 mL	0,23±0,04 ns
4	Vacuna	1,0 mL	0,50±0,07 ns
5	Placebo	1,0 mL	0,30±0,05 ns

TABLA 4. Comportamiento de la citotoxicidad materna entre los grupos de trabajo

Grupo	Sustancia	Dosis	% (PCE - NCE) ± DS
1	Ciclofosfamida	20 mg/kg	0,44 ±0,14***
2	Agua destilada	1,0 mL	2,18±0,24 ns
3	Vacuna	0,5 mL	1,51±0,37 ns
4	Vacuna	1,0 mL	0,94±0,90 ns
5	Placebo	1,0 mL	1,72±0,71 ns

(1,0 ml) presentaron frecuencia de células micronucleadas similar a la obtenida por el grupo control negativo (agua destilada) sin que existieran diferencias significativas entre ellos para $p \leq 0,05$, lo cual refleja que la vacuna vax-Spiral no causó daño clastogénico en las dosis utilizadas y por la vía utilizada.

La relación existente entre embriotoxicidad, teratogénesis y genotoxicidad ha sido ampliamente descrita por varios autores. La expresión del daño genético en células germinales tanto en la madre como en el padre se manifiesta generalmente como infertilidad, abortos espontáneos, muertes embrionarias y reducción del peso fetal,⁷ mientras que la expresión del daño genético en células somáticas depende de múltiples factores y mecanismos que no se encuentran aún esclarecidos.⁸

Estudios realizados con la ciclofosfamida demuestran una íntima relación entre el daño cromosómico causado en el hígado fetal (utilizando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios) y el efecto teratogénico causado por esta sustancia.⁹ Porter plantea la hipótesis, de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez.

La evaluación de la vacuna mediante el ensayo de MNTS ha demostrado que la

vacuna no resultó clastogénica en los fetos después de la exposición materna. Los estudios de embriotoxicidad y teratogénesis realizados con iguales niveles de dosis de vacuna (0,5 y 1,0 mL), han demostrado que no presenta efecto embriotóxico ni teratogénico en las ratas (González S, Friman M. Evaluación de la toxicidad embrionaria y fetal de la vacuna vax-Spiral. Tesis para optar por el título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, 1998. CENATOX, La Habana), lo que podría estar relacionado con la hipótesis planteada de la posible relación entre el efecto clastogénico y el daño estructural, ya que la vacuna antileptospirosis cubana (vax-Spiral) no resultó clastogénica, embriotóxica, ni teratogénica.

Las dosis de 0,5 y 1,0 mL, correspondientes con las dosis terapéutica y doble de la vacuna vax-Spiral respectivamente, así como las dosis de placebo, presentaron valores de células micronucleadas estadísticamente no significativos en relación con los reportados para el agua destilada (grupo 2), utilizada en este experimento como control negativo por su demostrada inocuidad.¹⁰ Estos resultados nos permiten plantear que bajo nuestras condiciones, ni la vacuna vax-Spiral, ni el vehículo, resultaron citotóxicos en la médula ósea materna, ni genotóxicos en madres y fetos.

SUMMARY: The transplacental micronuclei trial has been developed aimed at evaluating the genotoxic potential in the descendants, demonstrating the capacity of an agent for causing chromosomal damages during the prenatal period. The registration of the chromosomal aberrations shows when a specific substance may be clastogenic or aneugenic in the fetus through the maternal exposure. In the present paper, the genotoxic potential of the Cuban vax-Spiral antileptospirosis vaccine developed by "Finlay" Institute to immunize the risk groups, where the pregnant may be included, is evaluated by using this method. The vax-Spiral vaccine and the placebo did not have clastogenic effects in any of the doses evaluated by this assay under our experimental conditions.

Subject headings: VACCINES/isolation & purification; LEPTOSPIROSIS; PREGNANCY; MICRONUCLEUS TESTS/methods; MUTAGENICITY TESTS/methods.

Referencias bibliográficas

1. Farrar EW. Leptospira species. En: Macedell GL, Douglas R, Bennet J. Principles and practice of infectious diseases. 4ta ed. London: Churchill Livingstone, 1995:1813-6.
2. MINSAP. Cuadro epidemiológico Nacional. La Habana, 1981.
3. Martínez R, Cruz R, López C. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la Leptospirosis Humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop 1993;45(1):32-41.
4. Nelson WE, Berhnam RE. Leptospirosis. En Nelson WE, Berhman RE. Tratado de Pediatría. New York: Mc Graw-Hill, 1992;1:949-51.
5. Aguirre C. Leptospirosis. En: Medicina Interna. Barcelona: Ediciones Doyma, 1992:2319-20.
6. Muller L. Micronucleus induction in mouse and rat fetuses treated transplacentally during histogenesis with Mitomicin C and 7,12- Dimethyl Benz(a) antracene. Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis 1998 (5).
7. Porter A, Singh G. Trasplacental teratogeneiss and mutagenesis in mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis. 1998;8:191-203.
8. Hayshi M, Tice R, Mac Gregor J, Romagna F, Pacchierotti F. In vivo rodents erythrocyte micronucleus assay. Mutat res. 1994;312:293-304.
9. Domínguez Y, Friman M. Montaje y estandarización de la técnica de Micronúcleos Trasplacentarios. I Taller Latinoamericano sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. X Congreso Latinoamericano de Toxicología.
10. Cole R. J, Handerson L, Taylor N. A, Arlett and Reagan T. Short term test for transplacental active carcinogens. A comparison of sister chromatid exchanges and the micronucleus test in mouse foetal liver. Mutat res.1983.113:61-75.

Recibido: 29 de mayo del 2001. Aprobado: 30 de junio del 2001.

Lic. Joaquina Roxana Fraga Álvarez. Centro Nacional de Toxicología HMC "Dr. Carlos J. Finlay". Calle 114 y Ave. 31, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.