

Centro Nacional de Toxicología

## ***EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EMBRIONARIA Y FETAL DE LA VACUNA ANTILEPTOSPIRÓSICA VAX-SPIRAL***

*Lic. Marcia Friman Pérez,<sup>1</sup> Lic. Susana B. González Hervis,<sup>2</sup> Lic. Joaquina R. Fraga Álvarez,<sup>2</sup> Lic. Yordanka Domínguez Linares,<sup>3</sup> Dr. David N. Oquendo León y Téc. Cristina Pérez Rodríguez<sup>4</sup>*

**RESUMEN:** Ante el incremento en la presentación de casos de leptospirosis, en Cuba se llevó a cabo la obtención y desarrollo de la vacuna antileptospirósica vax-Spiral, en el Instituto Finlay, a partir de cepas circulantes aisladas en nuestro medio. El estudio de embriotoxicidad y teratogénesis de esta vacuna se realizó en ratas Sprague-Dawley preñadas, a las que se administró diferentes dosis de la vacuna vax-Spiral durante el período de organogénesis, con el objetivo de evaluar sus potencialidades tóxicas en el organismo materno, embrionario y fetal. Los resultados obtenidos muestran que la administración de la vacuna a ratas gestantes, no evidenció toxicidad materna. En nuestras condiciones experimentales, no hubo diferencias estadísticamente significativas, respecto a los parámetros de toxicidad embrionaria y fetal evaluados entre los grupos de animales tratados con la vacuna, ni con respecto a los controles a los que se les administró el vehículo.

**DeCS:** VACUNAS/aislamiento & purificación; LEPTOSPIROSIS; TESTS DE TOXICIDAD/métodos; TERATOGENOS/toxicidad; RATAS SPRAGUE-DAWLEY.

La leptospirosis es una antropozoonosis ampliamente extendida en el planeta<sup>1,2</sup> y se presenta con mucha más frecuencia en los países tropicales. Se conoce que es dañina tanto para los animales como para el hombre y se describe como una enfermedad infecto-contagiosa-aguda, cuyo agente causal es la bacteria *Leptospira interrogans*, especie patógena del género *leptospira*.<sup>3</sup>

Las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad son fiebre, cefalea, deshidratación, hemorragia y deficiencias renales y hepáticas.<sup>4</sup> Se reportan además, abortos espontáneos, lesiones fetales y muerte fetal, tanto en animales como en mujeres que han sufrido la enfermedad durante la gestación.<sup>2,5,6</sup>

En la actualidad, las investigaciones acerca de la leptospirosis adquieren mucha

<sup>1</sup> Licenciada en Biología. Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Licenciados en Ciencias Farmacéutica.

<sup>3</sup> Licenciados en Ciencias Farmacéuticas.

<sup>4</sup> Técnica en Procesos Biológicos.

importancia por el incremento de la presentación de casos. Ante esta situación, una de las principales medidas preventivas es la vacunación y el objetivo fundamental a cumplimentar ha sido la obtención de una vacuna cubana a partir de cepas circulantes aisladas en nuestro medio.

En nuestro país existen las condiciones ambientales favorables que posibilitan la alta incidencia y morbilidad de dicha enfermedad.<sup>3</sup> Es por eso que teniendo en cuenta sus características, su efecto sobre animales y mujeres embarazadas y su repercusión económica y social, nuestro trabajo tiene como objetivo:

- Realizar la evaluación embriotóxica y teratogénica de la vacuna vax-Spiral, como parte del programa de evaluaciones preclínicas que debe cumplimentarse para su registro y posterior empleo en humanos.

## Métodos

Se utilizaron ratas de la línea Sprague-Dawley jóvenes (10 a 11 sem), vírgenes y en edad reproductiva, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, con un peso entre 180 y 200 g. Éstas se mantuvieron, durante todo el experimento, con un régimen de temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , con una humedad de 50 a 70 % y un fotoperíodo de 12 h luz durante el cual se les proporcionó agua y alimento a voluntad.

Los animales fueron sometidos a un período de adaptación de 2 sem y se aleatorizaron utilizando el sistema computadorizado *Labtools*, para conformar 6 grupos experimentales de 20 hembras preñadas cada uno.

Los machos fueron colocados en cajas individuales y en horas de la tarde se aparearon a razón de 2 hembras por macho. A la mañana siguiente se realizó el exudado

vaginal, con el objetivo de verificar la cópula. La presencia de espermatozoides en el exudado vaginal se tornó como signo de preñez y se consideró este día como el día cero de la gestación.

A las hembras preñadas se les administró la vacuna o el vehículo a 2 niveles de dosis 0,5 y 1 mL por vía intraperitoneal en diferentes estadios de la organogénesis, como se presenta en la tabla 1.

TABLA 1.

Grupo	Inoculación (días de la gestación)	Dosis (ml)	Producto a administrar
1	6 y 15	0,5	Vacuna
2	6 y 15	1,0	Vacuna
3	6, 10 y 15	0,5	Vacuna
4	6, 8, 10, 12 y 15	0,5	Vacuna
5	6, 8, 10, 12 y 15	0,5	Vehículo
6	6 y 15	1,0	Vehículo

Las hembras preñadas fueron pesadas y observadas diariamente, con el objetivo de detectar la presencia de sangre en la vagina como índice de aborto.

Se realizaron determinaciones de hemoglobina y hematócrito, los días 0 y 20 de la preñez. Se registró el número de cuerpos lúteos, implantaciones, fetos vivos, muertes tempranas y tardías, peso fetal, peso materno y peso de los órganos (hígado, riñón y útero grávido), el día del sacrificio.

Se revisaron todos los fetos minuciosamente para observar la presencia de malformaciones externas. Para la determinación de fetos con malformaciones viscerales se fijó la mitad de estos en *Bouin* y posteriormente se les realizaron los cortes de *Wilson*;<sup>7</sup> los restantes fetos se fijaron en alcohol al 95 % y se analizaron en busca de malformaciones óseas, siguiendo los procedimientos de aclaración y tinción de fetos con rojo de alizarina S, según *Dawson*.<sup>8</sup>

A las variables estudiadas se les realizó el análisis de normalidad de la muestra y homogeneidad de las varianzas, ambos por la prueba de *Bartlett-Box*. Además se les

realizó el análisis de varianza por la prueba de ANOVA a las que corresponden a peso materno, útero grávido y peso relativo de hígado y riñones.

A las variables cuyas varianzas no fueron homogéneas se les realizó la prueba de *Fisher* y a aquellas que no tuvieron distribución normal se les realizaron las pruebas no paramétricas *Kruskal-Wallis*.

## Resultados

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la toxicidad materna, embrionaria y fetal, de la vacuna antileptospirósica cubana vax-Spiral, en ratas Sprague-Dawley preñadas cuya edad oscila entre 10 y 11 sem (ver tablas 2, 3 y 4).

TABLA 2. Evaluación de la toxicidad materna

VARIABLES	N	X±DS Grupo 1	X±DS Grupo 2	X±DS Grupo 3	X±DS Grupo 4	X±DS Grupo 5	X±DS Grupo 6
Peso (día 0) (g)	20	212,2±14,6	214,4±16,3	205,5±12,7	210,4±15,9	209,4±7,00	210,3±14,5
Peso (día 20) (g)	20	309,3±34,7	311,6±30,1	317,2±17,1	307,2±20,8	315,1±10,3	311,0±22,6
Hemoglobina (g/dL)	20	11,3±0,7	11,4±0,9	11,2±0,9	11,4±1,1	11,6±1,1	11,6±0,9
Hemoglobina <sub>20</sub> (g/dL)	20	10,0±1,1	9,9±1,7	9,7±1,6	9,4±1,0	9,7±0,9	10,8±1,6
Hematócrito <sub>0</sub> (pcv)	20	0,41±0,25	0,41±0,25	0,40±0,35	0,41±0,29	0,40±0,30	0,40±0,33
Hematócrito <sub>20</sub> (pcv)	20	0,36±0,37	0,35±0,59	0,36±0,54	0,36±0,60	0,36±0,20	0,35±0,96
Útero grávido (g)	20	50,0±21,0	56,9±16,6	60,9±11,9	51,7±19,0	60,1±10,8	49,9±22,8
Riñón derecho (g)	20	0,7±0,08	0,7±0,10	0,7±0,10	0,7±0,08	0,7±0,05	0,7±0,10
Riñón izquierdo (g)	20	0,7±0,10	0,70±1,06	0,7±0,09	0,7±0,08	0,7±0,10	0,7±0,08
Hígado (g)	20	9,7±1,00	10,2±0,90	10,7±1,20	10,3±0,90	10,2±0,80	10,0±1,40

p < 0,05

TABLA 3. Efecto embriotóxico

VARIABLES	N	X±DS Grupo 1	X±DS Grupo 2	X±DS Grupo 3	X±DS Grupo 4	X±DS Grupo 5	X±DS Grupo 6
Cuerpos lúteos	20	14,7±2,9	15,3±2,7	15,2±3,5	14,5±3,5	15,1±3,0	14,5±4,8
Implantes	20	10,0±3,4	9,9±3,9	11,4±1,6	10,1±3,4	11,5±1,7	9,7±4,2
Fetos vivos	20	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1
Muertes tempranas	20	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1	10,0±1,1
Muertes tardías	20	0	0	0	0	0	0
Peso de machos	20	3,60±0,3	3,70±0,3	3,70±0,6	3,70±0,2	3,60±0,3	3,80±0,2
Peso de hembras	20	3,60±0,3	3,60±0,2	3,70±0,5	3,60±0,3	3,60±0,3	3,60±0,3
Peso total	20	3,60±0,3	3,60±0,2	3,70±0,9	3,60±0,3	3,60±0,2	3,70±0,3

p < 0,05

TABLA 4. Fetos con anomalías esqueléticas y viscerales por camada

VARIABLES	N	Grupo 1 %	Grupo 2 %	Grupo 3 %	Grupo 4 %	Grupo 5 %	Grupo 6 %
Fetos con anomalías esqueléticas por camada	20	1,35	1,05	0,65	1,06	0,85	1,45
Fetos con anomalías viscerales por camada	20	1,45	1,10	0,30	1,05	0,85	0,70
Total de fetos con anomalías por camada	20	2,80	2,15	0,95	2,11	1,70	2,15

p < 0,05

## **Discusión**

### **TOXICIDAD MATERNA**

La administración durante la organogénesis de la vacuna vax-Spiral y del vehículo (alhidrogel) a ratas Sprague-Dawley, no evidenció toxicidad materna, ya que no se afectó el peso corporal de las madres y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados, con respecto al peso de los órganos (riñones, hígado y útero grávido), corroborando los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad general (*Arnoroto R.M.* Ensayo de embriotoxicidad y teratogénesis. Controles negativos y positivos en ratas y conejos. Tesis para optar por el título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, 1996. CENATOX, La Habana).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con las diferentes dosis de la vacuna y el vehículo, con respecto a las cifras de hemoglobina y hematócrito; aunque el día cero de la preñez los animales presentaron valores más bajos de hemoglobina y hematócrito, que los reportados en la literatura para ratas Sprague-Dawley de 10 a 13 sem. Esto podría deberse a factores nutricionales.

### **Toxicidad embrionaria y fetal**

La administración de la vacuna y el vehículo no afectó los parámetros embrionarios y fetales, ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los animales tratados con las diferentes dosis de la vacuna y el vehículo, en cuanto al número de cuerpos lúteos, implantaciones,

fetos vivos, muertes tempranas y tardías, donde se obtuvo valores similares a los controles negativos históricos del Laboratorio de Toxicología Reproductiva del Centro Nacional de Toxicología y a los reportados en la literatura.<sup>9</sup>

El comportamiento del peso corporal de los fetos, el número de anomalías y de fetos con anomalías por camada, tanto esqueléticas como viscerales, fue similar entre los grupos tratados con la vacuna y los controles a los que se les administró el vehículo.

En este estudio, se encontró que el número de fetos con anomalías por camada resultó mayor que el reportado para esta línea de ratas; esto podría estar relacionado con el hecho de que al inicio y al final del experimento, los animales presentaron cifras de hemoglobina por debajo de 11,0 g/dL y estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Toxicología Reproductiva del Centro Nacional de Toxicología, reportaron una correlación positiva entre el número de fetos con anomalías por camada, cuyas madres presentaron cifras de hemoglobina menores de 11,0 g/dL al finalizar la preñez. Este resultado podría ser atribuido a factores nutricionales, teniendo en cuenta que la demanda de nutrientes es mucho mayor durante la gestación, y que la línea de ratas Sprague-Dawley ha sido históricamente reportada como adecuada para la ejecución de estudios reproductivos por su bajo índice de anomalías espontáneas.

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de la vacuna vax-Spiral y del vehículo, a las dosis y vía de administración utilizadas, no resultó embriotóxica ni teratogénica, ni indujo toxicidad materna, en las condiciones experimentales.

**SUMMARY:** As a result of the increase of cases of leptospirosis in Cuba, the vax-Spiral antileptospirosis vaccine was obtained and developed from circulating strains isolated in our environment at "Finlay" Institute. The study of embryotoxicity and teratogenesis of this vaccine was conducted in Sprague-Dawley pregnant rats that were administered different doses of the vax-Spiral vaccine during the period of organogenesis in order to evaluate its toxic potentialities in the maternal, embryonic and fetal organism. According to the results, no maternal toxicity was observed among the pregnant rats that received the vaccine. Under our experimental conditions, no statistically significant differences were found neither in the parameters of embryonic and fetal toxicity evaluated in the groups of animals treated with the vaccine, nor in the controls that were administered the vehicle.

Subject headings: **VACCINES/isolation & purification; LEPTOSPIROSIS; TOXICITY TESTS/methods; TERATOGENS/toxicity; RATS, SPRAGUE-DAWLEY.**

### **Referencias bibliográficas**

1. Coto O. Espiroquetas de importancia en patología humana. En: Rojas N, Coto O. Temas de Microbiología Clínica II. Tomo II. La Habana: Universidad de La Habana, 1989:414-23.
2. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C. Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana. J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris 1995;24(4):418-21.
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. Aguirre C. Leptospirosis. En: Medicina Interna. Barcelona: Ediciones Doyma, 1992:2319-20.
5. Bernard WV, Bolin C, Riddle T, Durando M, Smith BJ, Tranontin R. Leptospirosis abortion and leptospiruria in horses from the same farm. J Am Vet Med Assoc 1993;202(8):1285-6.
6. Poonacha KB, Donahue JM, Giles RC, Hong CB. Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. Vet Pathol 1993; 30(4):362-9.
7. Wilson J, Warkany J. Teratology. Principles and Techniques. Chicago: University Chicago Press, 1965.
8. Dawson A. Note on staining of skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. Stain Technol; 123, 1926. Editorial Fluoride in fetal bones and teeth. Rev. Oct, p 297, 1964.
9. Lu FC. Teratogene. En: Basic Toxicology Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment. 3 ed. Miami, 1996, 132-40.

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

Lic. Marcia Friman Pérez. Centro Nacional de Toxicología, HMC "Dr. Carlos J. Finlay". Calle 114 y Ave. 31, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.