

Evaluación de la toxicidad por dosis única de la vacuna antidiftérica-antitetánica en ratas Sprague-Dawley

Yulieé López, Sergio Sifontes, Juan F. Infante, Daiyana Díaz, Mónica Obaya, Eduardo Álvarez, Eligio Sosa, Tamara Hernández, Viviana Pérez, Yolanda Valdés, Isabel García, Vismark Torres, Elina Parajón, Adriana Ponce, Niurka González, Maylén Argamasilla.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: Ylferia@finlay.edu.cu

En el presente ensayo se evaluó la toxicidad por dosis única de la vacuna antitetánica-antidiftérica (VA-DIFTET®) en ratas Sprague-Dawley. Para ello se utilizó la vía intramuscular por ser la propuesta a usar en humanos. Se administraron 0,3 mL de la vacuna o sus componentes a un total de 20 animales por grupo (10 de cada sexo). Los mismos se observaron diariamente: se midió el consumo de agua y alimento en días alternos y se determinó el peso corporal con intervalos semanales. Se incluyó el análisis anatomopatológico de los animales al final del estudio. Ninguno murió durante el ensayo ni se observaron síntomas clínicos. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,1$) en cuanto al consumo de agua, alimentos y el peso corporal. En el estudio anatomopatológico se observaron lesiones granulomatosas macrofágicas en las ratas tratadas con la vacuna o con el placebo, hallazgo este característico de las vacunas adyuvadas con hidróxido de aluminio. Los resultados sugirieron que la vacuna VA-DIFTET® es potencialmente inocua al administrar la dosis única por vía intramuscular.

Palabras clave: Toxicología, dosis única, difteria, tétano, toxoide, vacuna, rata, Sprague Dawley

Introducción

Desde tiempos remotos el hombre ha tratado de prevenir las enfermedades y una forma eficiente de hacerlo es a través de la vacunación. Con respecto a este tema existe una revolución en el tema regulatorio para evitar la salida al mercado de productos dañinos a la salud humana. Es por ello que se han implementado pruebas en animales para explorar el potencial tóxico de los productos antes de ser probados en humanos (1, 2).

La vacuna antidiftérica-antitetánica VA-DIFTET® consiste en una preparación de anatoxinas diftérica y tetánica. La toxina diftérica se obtiene por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* (cepa Park Williams # 8), la que se somete a detoxificación y purificación para lograr la anatoxina o toxoide. Similarmente, se obtiene la anatoxina tetánica mediante cultivo de *Clostridium tetani* (cepa Harvard). Las anatoxinas

son adsorbidas a un gel de hidróxido de aluminio y se añade tiomersal como preservante (13).

Respondiendo a las exigencias de las normas internacionales para la evaluación de vacunas, CPMP/ SWP/ 465/95 de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMEA) se realizó, en el presente trabajo, la prueba de toxicidad por dosis única a la vacuna VA-DIFTET® (8). Esta prueba permite estudiar la toxicidad causada por la administración de una dosis de las sustancias de ensayo.

Materiales y Métodos

Animales: Se usaron ratas Sprague Dawley de ambos sexos, de 5 a 6 semanas de edad y con un peso corporal de 150-200 g. Estas fueron suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio de Cuba (CENPALAB). Al recibirse los animales fueron colocados, de acuerdo con el sexo, en cajas de

policarbonato Tipo-IV (superficie de piso 1800 cm²) a razón de cinco animales por caja. El material de encamado fue bagazo de caña de azúcar (suministrado por el CENPALAB), esterilizado en autoclave (121 °C, 20 min, 1,5 Kgf/cm²) (6). El encamado se cambió dos veces por semana. Se suministró pienso peletizado propio para ratas (igualmente suministrado y certificado por el CENPALAB) y agua fresca “*ad libitum*”. Los locales donde se alojaron los animales mantuvieron a una temperatura de 22 ± 2 °C y una humedad relativa de 60 ± 5%. Se mantuvo un ciclo de 10 h luz y 14 h de oscuridad. Se realizó una cuarentena de siete días antes del comienzo del experimento. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con el Comité de Ética vigente (3, 7).

Diseño experimental: El estudio de dosis única tuvo una duración de 21 días, incluyendo la semana de adaptación. El esquema de tratamiento a evaluar constó de una inoculación al concluir la cuarentena a todos los animales del estudio, excepto los del grupo control.

Se empleó la vía intramuscular por ser la propuesta para uso clínico, aplicándose el máximo volumen éticamente permisible en las ratas de esta categoría por vía intramuscular en un solo punto (0,3 mL) (11).

Esta dosis en mg/Kg representó 34 veces la propuesta a aplicar en niños de 5 Kg de peso (4, 5).

En la Tabla 1 se resume el diseño de los grupos experimentales.

Tabla 1. Diseño de los grupos experimentales

Grupo	Tratamiento	Número de animales por sexo
I	Control no inoculado	10
II	Placebo	10
III	Anatoxina Diftérica	10
IV	Anatoxina Tetánica	10
V	Anatoxina Diftérica-Tetánica	10
VIII	Vacuna (VA-DIFTET®)	10

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

Peso Corporal: Los animales fueron pesados al comienzo y al final del período de adaptación, así como una vez a la semana mientras duró el estudio.

Consumo de agua: El agua se administró “*ad libitum*”, no obstante se determinó en días alternos el volumen consumido. Para ello se colocaron en cada jaula frascos con 750 mL de agua. Para estimar el consumo se calculará la diferencia entre el volumen suministrado y el volumen de agua remanente. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, esta diferencia se dividió entre el número de animales en la caja y el número de días transcurridos desde la última medición.

Consumo de alimento: Se suministraron 500 g de pienso en las tolvas de las jaulas. Para determinar la cantidad consumida se pesó el pienso residual de la tolva y se determinó la diferencia con el suministrado. Esta operación se realizó en días alternos.

Estudio anatomopatológico: Dos semanas después de la inoculación todos los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg) por vía intraperitoneal y sometidos a necropsia. Se realizó el examen histopatológico a todos los órganos que mostraron alteraciones macroscópicas durante la necropsia, se incluye el punto de inoculación (músculo y ganglio linfático). Las muestras fueron fijadas en formol neutro al 10% durante las primeras 24 h y luego se transfirieron a una solución menos concentrada (4%). El procesamiento se llevó a cabo por el método rutinario de inclusión y cortes en parafina. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico

Peso corporal: El peso corporal se midió semanalmente y procesó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, analizando cada sexo y tiempo por separado.

Consumo de agua y alimento: Para realizar el análisis estadístico de estas dos variables se hicieron grupos de observaciones en el tiempo (correspondiendo a las semanas de observación) como un procedimiento de bloqueo para evitar un

incremento innecesario del error experimental. Se comparó el consumo mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x sexo x tiempo).

Lesiones macroscópicas y microscópicas: La frecuencia de las lesiones se comparó mediante análisis log-lineal y la prueba exacta de Fisher.

Paquete estadístico y nivel de significación: Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico STATISTICA [StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com]. Los valores de

$P < 0,05$ se consideraron significativos desde el punto de vista estadístico.

Resultados y Discusión

Mortalidad y signos clínicos: Ningún animal murió durante el ensayo ni se observaron síntomas clínicos en ninguno de los animales.

Peso corporal: Se hizo un test de Kruskal-Wallis (ANOVA por rangos) para comparar los tratamientos según sexo y tiempo y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2: Peso vivo promedio (g) de las ratas.

Tratamientos	Hembras				Machos			
	0 días	7 días	14 días	Medias*	0 días	7 días	14 días	Medias
Difteria	190,9	205,8	218,6	205,1	230,6	276,8	329,7	279,1
Tétanos	201,7	205,5	219,9	209,1	241,5	289,0	335,2	288,6
Difteria-Tétanos	201,4	209,7	228,1	213,1	237,3	283,7	311,9	277,6
Vacuna	192,4	202,8	217,4	204,2	246,0	273,4	331,9	269,8
Placebo	186,2	202,7	212,9	200,6	232,6	279,8	323,5	278,6
Control	197,0	208,2	223,3	209,5	230,8	280,4	325,2	278,8
Medias**	199,4	205,8	220,03	206,9***	229,5	280,5	326,2	278,7***

* Media por tratamiento, ** Media por tiempo, *** Media por sexo

Consumo de Alimentos: El consumo de alimentos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamientos ($P > 0,5$) (Tabla 3). Los machos consumieron más que las hembras ($P < 0,05$) y no hubo interacción

significativa entre los sexos y los tratamientos ($P > 0,1$). Las medias de todos los grupos fueron de 15-21 g para las hembras y de 25-30 g para los machos, con una media general de 23,8 g.

Tabla 3: Consumo promedio de alimento (g) por animal / día según sexo, grupo, tratamiento y tiempo postinoculación (semanas)

Tratamientos	Hembras			Machos		
	Semana 1	Semana 2	Media*	Semana 1	Semana 2	Media*
Difteria	17,1	18,8	18,0	25,6	27,0	26,3
Tétanos	15,3	18,1	16,7	26,1	30,3	28,2
Difteria-Tétanos	18,5	20,9	19,7	26,3	28,5	28,6
Vacuna	20,0	19,8	19,9	26,3	30,8	28,6
Placebo	16,8	17,8	17,3	26,0	28,8	27,4
Control	17,6	18,9	18,3	25,2	28,4	26,8
Media**	17,6	19,1	18,3***	25,9	29,0	27,4***

Media general: 23,8 mg

*: Media por tratamiento. **: Media por semana. ***: Media por sexo.

Consumo de Agua: El consumo de agua no mostró diferencias estadísticas entre los grupos experimentales [$P > 0,1$ (Tabla 4)]. En general, los machos consumieron más que las hembras ($P < 0,01$) y el consumo medio diario fue de

35,5 mL por animal. Lo mismo el consumo promedio de agua que el de alimento se encontraron entre los rangos normales descritos para esta especie y categoría de animales (12).

Tabla 4: Consumo medio diario de agua (mL) por animal según sexo, grupo tratamiento y tiempo postinoculación

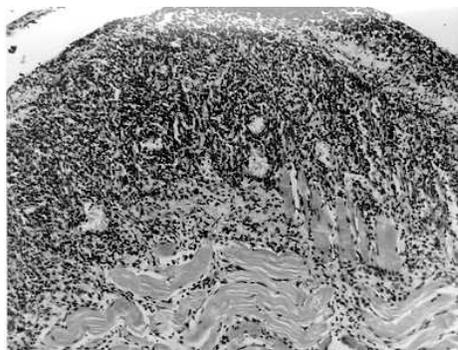
Tratamientos	Hembras			Machos		
	Semana 1	Semana2	Media*	Semana 1	Semana2	Media*
Difteria	27,9	35,8	31,9	40,1	37,0	38,6
Tétanos	31,1	34,8	33,0	40,6	40,7	40,7
Difteria-Tétanos	31,0	32,7	31,9	42,4	37,8	40,1
Vacuna	28,9	31,5	30,2	45,4	38,5	42,0
Placebo	32,9	34,3	33,6	34,3	36,7	35,5
Control	30,4	32,8	31,6	37,6	37,2	37,4
Media**	30,4	33,7	32,0***	40,1	38,0	39,1***

Media general: 35,5 mL

*: Media por tratamiento, **:Media por semana, ***:Media por sexo

Estudio Anatomopatológico: Ninguno de los animales en el ensayo mostró alteraciones macroscópicamente visibles de valor diagnóstico. Desde el punto de vista microscópico se observaron formaciones granulomatosas de tipo macrofágico, bien encapsuladas, en hembras y machos de los grupos vacunados y placebo (Figura 1).

Figura 1: Músculo de una hembra Sprague Dawley del grupo placebo.



La frecuencia de presentación de los granulomas fue similar en los animales vacunados y en los

placebos ($P > 0,5$). Estos granulomas se han observado en múltiples vacunas, por lo que se ha comprobado que el hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante es el responsable del desarrollo de las lesiones granulomatosas (9). Se ha demostrado que los granulomas desempeñan un importante papel en la duración de la respuesta inmune (10).

Es interesante que las hembras mostraron mayor frecuencia de lesiones en el músculo que los machos ($P < 0,01$). Esto pudiera deberse a que la hembra tiene menor masa muscular, por lo que sería proporcionalmente mayor la dosis a nivel de punto de inoculación con respecto al macho. No obstante, a nivel del ganglio linfático regional estas diferencias no fueron significativas ($P > 0,1$).

El peso vivo de los animales, así como el consumo de agua y alimentos no mostraron diferencias entre grupos de tratamiento que indicaran toxicidad del producto probado; las lesiones anatomopatológicas observadas responden y son atribuibles al adyuvante de vacunas actualmente en uso clínico.

Tabla 5: Frecuencia de aparición de las lesiones durante el estudio anatomopatológico.

Sexo	Grupo	Lesiones (%)		Frecuencia General (%)
		Músculo	Ganglio	
Machos	Difteria	0	0	0
	Tétanos	0	0	0
	Difteria-Tétanos	0	0	0
	Vacuna	40	20	30
	Placebo	30	40	35
	Control	0	0	0
Hembras	Difteria	0	0	0
	Tétanos	0	0	0
	Difteria-Tétanos	0	0	0
	Vacuna	80	60	70
	Placebo	80	40	60
	Control	0	0	0

Teniendo en cuenta que en este estudio no se observaron muertes, ni se registraron síntomas que indicaran toxicidad local ni sistémica, llegamos a la conclusión de que bajo las condiciones de este estudio y según las variables medidas, la vacuna VA-DIFTET® es potencialmente inocua por administración intramuscular a dosis única en ratas Sprague Dawley de esta categoría.

Referencias

1. Las nuevas vacunas y los aspectos regulatorios. Boletín para Profesionales ANMAT. 1999; 7(4): 61- 2.
2. Normas sobre Medicamentos de la Comunidad Europea, Vol. III. "Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano". Directrices Farmacotoxicológicas. Página 91 (No. 2, sec. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE). Versión español. Enero 1989 y 1998.
3. Manual para el manejo de los animales de laboratorio. Canadian Council on Animal. 1980
4. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Vol. 1 and 2. Organization for Economic Cooperation and Development. Prot. 407. Paris 1993.
5. Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD). Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio. Medio Ambiente Monograph No. 45.1992.
6. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Resolución Ministerial No. 152/92. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de Calidad en Ensayos Toxicológicos.
7. Buenas Prácticas de Laboratorio. Cuban Standard NC-212 (1992).
8. Regulaciones de vacunas. Agencia Europea para la Evaluación de Productos medicinales (EMA) CPMP/SWP/465/95. Junio de 1998.
9. Rajesth K, Gupta G, Siber R. Adjuvants for human vaccine-current status, problems and future prospects. Review. *Vaccine*: 1995;13(14):1263-1276.
10. Comité Asesor de Vacuna. Guía de vacunación. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene. Madrid. 2002.
11. Zúñiga J, Pur JA, Silvana M, Piñeiro R. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Madrid: Editorial Mc. Graw-Hill. Interamericana de España. S.A.U.; 2002.
12. Cynthia S. Gillett. Procedures of Animal Care, a Manual for Animal Care Technicians, <http://www.ahc.umn.edu/rar/pac2002.html#RodentWatering>, Last update 4/2002.
13. Instituto Finlay. Registro Médico Sanitario VA-DIFTET®. La Habana: Instituto Finlay. Año 2003.

Evaluation of toxicity by single dose of the Diphtheria-Tetanus Vaccine in Sprague Dawley rats

Abstract

The present paper evaluates the toxicity by single dose of the diphtheria-tetanus vaccine (VA-DIFTET®) in Sprague Dawley rats. Its administration was carried out by intramuscular route because this is the one proposed for use in humans. 0.3 mL of the vaccine or its components was administered to a total of 20 animals per group (10 per each sex). These animals were daily observed and, water and food intake was measured on alternate days determining their body weight with week intervals. The anatomopathological analysis of animals was included at the end of the study. No animal died during the assay or clinical symptoms were observed either. No statistically significant differences ($p > 0,1$) were detected regarding water-food intake and body weight. In the anatomopathological study, macrophagic granulomatous lesions were observed in the rats treated with the vaccine or placebo; this finding is characteristic of vaccines adjuvated with aluminum hydroxide. Results suggested that VA-DIFTET® is potentially innocuous when administering the single dose by intramuscular route.

Keywords: Toxicology, single dose, diphtheria, tetanus, toxoid, vaccine, rat, Sprague Dawley.