

# Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley

Juan F. Núñez, Lucy Herrera, Juan F. Infante, Pablo González, Viviana Pérez, Maylén Argamacilla, Jorge Mayo, Eligio Sosa, Néstor González, José Dupuig, Vismark Torres, Niurka Rodríguez.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600.  
Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: jnunez@finlay.edu.cu

La vacuna antimeningocócica tipo B, objetivo de este estudio, contiene vesículas purificadas de la membrana externa del meningococo del serogrupo B de la cepa (Cu- 385 - 83 ) B:4:P1.19,15. El esquema de vacunación propuesto en humanos consiste en tres dosis de 0,5 mL, separadas por un intervalo óptimo de ocho semanas. El objetivo de este estudio de toxicidad en ratas Sprague Dawley (SD) fue determinar la toxicidad potencial, letalidad, órganos, 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 del estudio y según los criterios establecidos para evaluar los resultados, la vacuna antimeningocócica tipo B, no produce efectos tóxicos en el modelo animal usado. Todo lo que se observó fueron formaciones granulomatosas a nivel del punto de inoculación. Estas formaciones han sido reportadas como pertenecientes a los adyuvantes de depósito, como el hidróxido de aluminio, usado en otras vacunas parenterales. Se concluye que la vacuna antimeningocócica tipo B resultó satisfactoria en las pruebas de toxicidad por dosis única y tolerancia local realizadas en la especie rata.

**Palabras clave:** Toxicidad, dosis única, tolerancia local, vacuna antimeningocócica, ratas

## Introducción

Alrededor del 90% de los casos reportados por meningitis meningocócica a nivel mundial han sido causados por meningococos del serogrupo B (1). En el caso de Cuba existe una mayor incidencia de meningitis provocada por este serogrupo particularmente de la cepa (Cu- 385 - 83 ) B:4:P1.19,15 (2).

La vacuna antimeningocócica tipo B en estudio contiene vesículas purificadas de la membrana externa del meningococo del serogrupo B. A este complejo se añade el gel de hidróxido de aluminio estéril que presenta partículas de tamaño controlado, cloruro de sodio y fosfatos.

Esta vacuna es adecuada para la inmunización activa contra la enfermedad meningocócica causada por el serogrupo B. Se recomienda para la inmunización activa a personas de cualquier edad pasados los tres meses de nacidos, que vivan en áreas endemoepidémicas (3, 4).

El esquema de vacunación propuesto consiste en tres dosis de 0,5 mL cada una, separadas por un intervalo óptimo de ocho semanas. La segunda y tercera dosis son esenciales para lograr la protección (5, 6, 7). El objetivo de este estudio evaluativo de toxicidad aguda en rata Sprague Dawley (SD) fue determinar la posible letalidad causada por la administración de una dosis de la sustancia de ensayo, los posibles signos tóxicos después de su aplicación, así como los órganos y sistemas susceptibles a esta toxicidad potencial o cualquier otro efecto no deseado.

## Materiales y Métodos

Para este estudio se seleccionaron ratas SD de ambos sexos, de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal de 150 g a 200 g; las mismas

fueron suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), avaladas con su correspondiente certificado de salud y calidad genética.

Los animales fueron colocados de acuerdo con el sexo en cajas de suficiente tamaño para permitirles libertad de movimiento; se seleccionaron 5 al azar del mismo sexo y se colocaron en cajas T-IV (de polipropileno) con una superficie de 930 cm<sup>2</sup> y se distribuyeron en 3 estantes. El material con que se cubrió el suelo de las cajas fue bagacillo de caña, suministrado por el CENPALAB, previamente esterilizado y cambiado en días alternos.

El estudio estuvo compuesto por IV grupos de tratamiento que fueron analizados por dos vías de administración. A cada grupo se le asignó 5 animales por sexo para un total de 80 animales (40 machos y 40 hembras). Los mismos recibieron pienso para roedores, suministrado y certificado por el CENPALAB, y agua fresca *ad libitum*.

Los animales utilizados en este estudio se mantuvieron en observación durante 7 días antes del comienzo del experimento, como período de adaptación, siendo registrados los datos del peso corporal, consumo de agua y de alimentos en días alternos. Sólo se utilizaron animales sanos y debidamente certificados.

En las observaciones se registraron temperatura y humedad del alojamiento de los animales. La temperatura se mantuvo entre 21 a 25 °C y una humedad del 60% al 65%. Se utilizó un ciclo de luz / oscuridad de 12 h.

A cada jaula se le colocó una tarjeta rotulada con tinta permanente que contenía la siguiente información: fecha de comienzo y terminación del estudio, número de animales por caja, fecha de

recibo, sexo, origen, especie, código del estudio, grupo de tratamiento y vía de administración.

Para la identificación de los animales se utilizó un tatuador con números consecutivos.

La sustancia de ensayo fue la vacuna antimeningocócica tipo B cepa (Cu- 385 - 83) B:4:P1.19,15., lote 017, en bulbos de 1 dosis. Este lote satisfizo todas las normas nacionales y los requisitos establecidos por el Centro Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Las sustancias de ensayo fueron almacenadas a la temperatura indicada: de 2 °C a 8 °C y se utilizaron después de ser aceptadas por la Unidad de Aseguramiento de la Calidad.

El placebo estaba constituido por las sustancias siguientes:

Gel de hidróxido de aluminio	2 mg
Hidrógeno fosfato de disodio	0,03 mg
Hidrógeno fosfato de sodio dihidratado	0,02 mg
Cloruro de sodio	4,25 mg
Agua para inyección c.s.p.	0,5 mL

El diseño experimental se hizo conforme a las normas, guías y procedimientos establecidos en estudios toxicológicos para medicamentos (8, 9).

**Tabla 1. Grupos de tratamiento**

Grupo	Tratamiento	No de animales / sexo	Vías de administración	Volumen de dosis a aplicar
Grupo I	Vacuna antimeningocócica tipo B	5H / 5M	I.M	0,3 mL
		5H / 5M	I.P	0,5 mL
Grupo II	Complejos de proteínas presentes en las vesículas purificadas de la membrana externa del meningococo del serogrupo B + Sales (Hidrógeno fosfato de disodio, Hidrógeno fosfato de sodio dihidratado, Cloruro de sodio, Agua para inyección c.s.p.)	5H / 5M	I.M	0,3 mL
		5H / 5M	I.P	0,5 mL
Grupo III	Placebo (Gel de hidróxido de aluminio, Hidrógeno fosfato de disodio, Hidrógeno fosfato de sodio dihidratado, Cloruro de sodio, Agua para inyección c.s.p.)	5H / 5M	I.M	0,3 mL
		5H / 5M	I.P	0,5 mL
Grupo IV	Control (Animales no inoculados)	5H / 5M	—	—
		5H / 5M	—	—

Se realizó la observación clínica de los animales dos veces al día con el objetivo de ver si se presentaba alguna manifestación de signos de toxicidad del producto.

El estudio anatomopatológico comenzó el día 21 del experimento según el Protocolo para los grupos del I al IV, con la eutanasia de todos los animales luego de narcosis con éter, posteriormente se realizó la necropsia. Todos los animales fueron pesados usando balanzas Sartorius, modelos LC 6200S y LC 1200S.

Se tomaron muestras de aquellos órganos y sistemas que presentaron alguna alteración macroscópica. Los frascos para la recolección de las muestras fueron de color ámbar y se rotularon con el número correspondiente a cada animal, grupo de tratamiento, vía de administración especie y sexo; los mismos contenían una solución de formol neutro al 10%, en el que se colocaron las muestras envueltas

en una bolsa de gasa, con una tarjeta escrita con un marcador de grafito que tendrá como información el número del animal.

Todas las observaciones en los tejidos y órganos, músculo del punto de inoculación y ganglio regional fueron descritas y procesadas para el estudio anatomopatológico. Los órganos y tejidos seleccionados fueron fijados en una solución de formalina tamponada durante las primeras 24 h y posteriormente fueron transferidos a una solución de menor concentración (4%) hasta su uso. Los fragmentos de órganos y tejidos seleccionados a cada uno de los animales correspondientes a todos los grupos de estudio, fueron embebidos en parafina y cortados en secciones con un grosor de 4 a 6 micrones, usando un micrótopo modelo Leyca 1400. La dirección y el número de secciones fueron hechas según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la evaluación de productos tóxicos.

Las observaciones se realizaron con microscopios convencionales Leyca y Olympus (modelos DMLB y CH-2), respectivamente. Se hizo una descripción detallada de las observaciones recolectadas en los modelos de datos primarios destinados a la necropsia e histopatología. Se aplicó el modelo de clasificación triple (grupo, sexo y vía) con interacciones para el análisis de los resultados.

## Resultados y Discusión

Los cambios en el peso durante el experimento (Gráficos 1, 2, 3 y 4) muestran que este no estuvo adversamente afectado en los machos o hembras de ninguno de los grupos de tratamientos, el peso se comportó del mismo modo que el reportado para la línea animal usada (10).

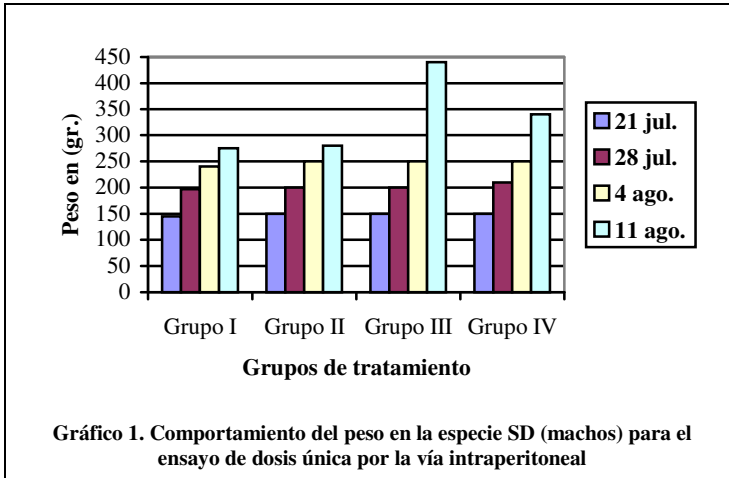


Gráfico 1. Comportamiento del peso en la especie SD (machos) para el ensayo de dosis única por la vía intraperitoneal

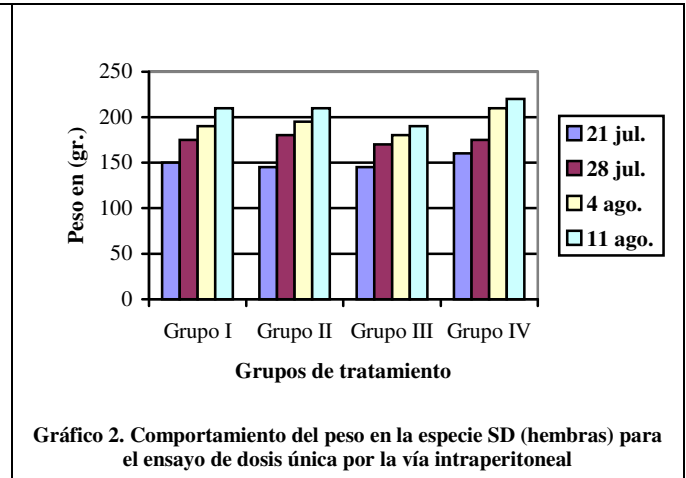


Gráfico 2. Comportamiento del peso en la especie SD (hembras) para el ensayo de dosis única por la vía intraperitoneal

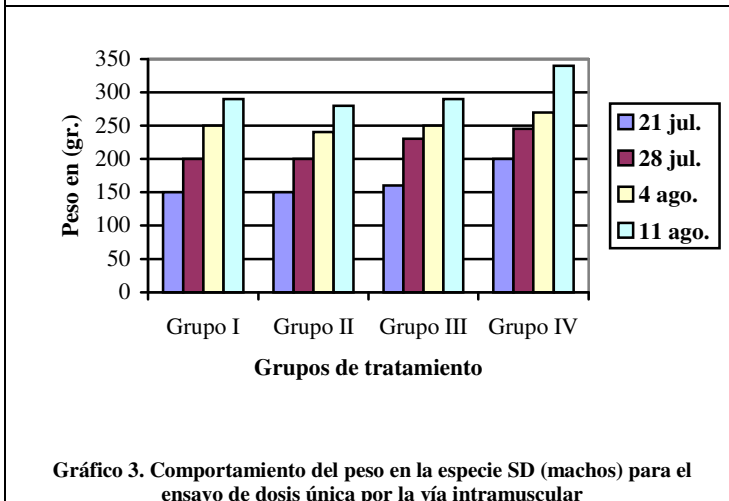


Gráfico 3. Comportamiento del peso en la especie SD (machos) para el ensayo de dosis única por la vía intramuscular

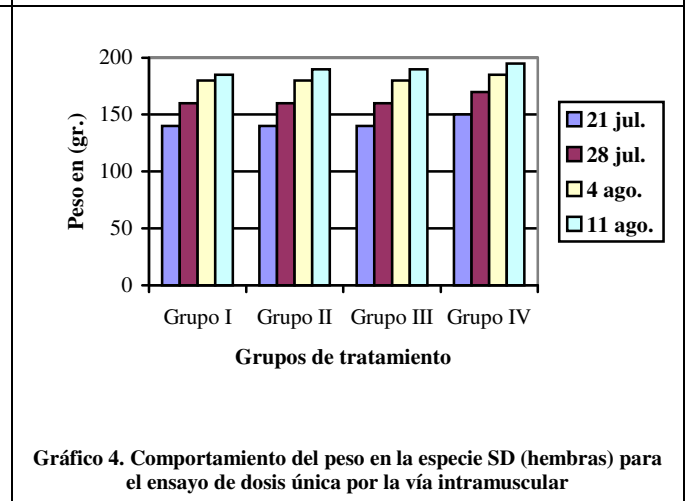


Gráfico 4. Comportamiento del peso en la especie SD (hembras) para el ensayo de dosis única por la vía intramuscular

El único efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) resultó ser el sexo. Ninguna interacción fue significativa.

El incremento en peso de los machos fue mayor que en las hembras, pero este comportamiento no está en contradicción con lo reportado en cuanto a la ganancia en peso para la especie animal utilizada en el estudio.

No hubo mortalidad y tampoco se observaron signos clínicos que pudieran ser atribuibles a la administración de la sustancia en estudio. Infante en estudios toxicológicos realizados a la vacuna VAMENGOC-BC®, obtuvo los mismos resultados (11, 12).

En las necropsias realizadas no se encontraron cambios macroscópicos en órganos y tejidos. Los estudios histológicos no

mostraron alteraciones en la citoarquitectura de los tejidos estudiados que pudieran ser atribuibles a procesos de tipo tóxicos. A pesar de esto en las ratas correspondientes al grupo de la vía intraperitoneal se observó formaciones granulomatosas de tipo macrofágicas, situadas encima de la serosa del peritoneo en animales de ambos sexos en los grupos II y III (Tabla 2). En los demás animales correspondientes a los distintos grupos no se observaron lesiones de valor diagnóstico.

Estas formaciones han sido reportadas como causadas por la aplicación de productos inmunizantes que presentan adyuvantes de depósito como el hidróxido de aluminio, las cuales han sido descritas y reportadas en estudios toxicológicos realizados a otras vacunas que contenían también estas sustancias (13).

Tabla 2. Dosis Única. Vía Intraperitoneal e Intramuscular, machos y hembras. Lesiones anatomopatológicas (%) por grupos

Grupos de Tratamiento	Hembras		Machos	
	Vía		Vía	
	IP	IM	IP	IM
Grupo I	80 %	----	100%	----
Grupo II	----	----	----	----
Grupo III	80%	----	60%	----
Grupo IV	----	----	----	----

## Conclusiones

Los animales inoculados no mostraron signos tóxicos dependientes de la administración de la sustancia de ensayo. El incremento en peso se comportó según lo reportado para esta especie animal. El estudio histopatológico no mostró ningún daño tisular y/o celular debido a la aplicación de la sustancia de ensayo. Se observaron sólo formaciones granulomatosas macrofágicas en el sitio de inyección. Estas formaciones han sido reportadas como típicas de los adyuvantes de depósito como el hidróxido de aluminio.

Bajo las condiciones de este estudio y según los criterios establecidos para la evaluación de los resultados, la vacuna antimeningocócica B, no produce daños tóxicos ni sistémicos en el modelo animal estudiado.

## Referencias

1. Tondella ML, Popovic T, Rosenstein NE, Lake DB, Carlone GM, Mayer LW, Perkins BA. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. *Clinic Microbiol* 2000; 38(9): 3323-8.
2. Alemán C. Reference database of main physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab. Anim* 1998; 32(4):457-466.
3. Dickinson F, Pérez A, Galindo M, Quintana I. Impacto de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b en Cuba. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health*. 2001;10:169-73.
4. Solárzano F, Miranda MG, Díaz RD. Meningoencefalitis bacteriana. *Enf Infecc y Micro* 2002;22:2-13.
5. Pérez A, Dickinson F, Tamargo I, Sosa J, Quintana I, Ortíz P, Morales M, Fumero A, García M, Quintana J, Venero S, Luján M, Cabrera MV, Font M, Rodríguez O, García R, Rodríguez L, Escobar ME, Castro A, Toledano E, Urgellés G, Rodríguez ME, Marín A, Llop A, Batlle MC, Fuentes K, Pérez M, Llanes R, Guzmán D, Gutiérrez O, Molina I, Toledo I. Resultados y experiencias de la vigilancia nacional de meningitis bacterianas en Cuba. *Biocología Aplicada*. 2003;20:188-22.
6. Baltimore RS, Jenson HB. Meningococcal vaccine: new recommendations for immunization of college freshmen. *Curr Opin Pediatr*. 2001;13:47-50. doi: 10.1097/00008480-200102000-00008.
7. Dickinson FO, Pérez AE. *BMC Infect. Dis*. 2005; 5: 103. published online before print November 15, 2005 PMID: 1299326. Bacterial Meningitis in children and adolescents: an observational study based on the national surveillance system
8. MINSAP. Regulaciones Metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos. Ed Ciencias Médicas, Ciudad Habana, 1993.
9. MINSAP. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de Calidad en Ensayos Toxicológicos. Resolución No. 152/92. Editorial Ciencias Médicas, Ciudad Habana, 1993.
10. Alemán C. Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal. *Lab. Anim* 2000;34(1):378-385.
11. Infante JF. Evaluación farmacológica de la vacuna VA-MENGO BC® en modelos murinos. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias, Instituto Finlay, Ciudad Habana, 2000.
12. Infante JF, Sifontes S, Muñoz E, González M, Pérez V, Baldor C, Fariñas M. Prueba toxicológica en ratones, de una sola dosis inicial y segura de la vacuna cubana antileptospirosis VAX-PIRAL. *Biocología Aplicada* 2001;18(1): 20-23.
13. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001; 124(9): 1821-1831.

## Study of toxicity by single dose and local tolerance of a meningococcal vaccine type B in Sprague Dawley rats

### Abstract

The meningococcal B vaccine contains purified outer membrane vesicles of serogroup B meningococcus of strain (Cu- 385 - 83) B: 4:P1.19, 15. The vaccination scheme proposed for humans consists in three doses of 0.5 mL, separated by an optimal interval of eight weeks. The objective of this toxicity study in Sprague Dawley (SD) rats was to determine potential toxicity, lethality, sensitive organs and systems and other adverse events as well as toxicity at the inoculation site after administration of one dose of the vaccine under study. Results indicated that, under the study conditions and according to the criteria established to evaluate results, the meningococcal B vaccine does not produce toxic effects in the animal model used. Only granulomatous formations at the level of the inoculation site were observed. These formations have been reported to be characteristic of deposit adjuvants like aluminium hydroxide used in other parenteral vaccines. It is concluded that the meningococcal B vaccine resulted to be satisfactory in the tests of toxicity by single dose and local tolerance carried out in rats.

**Keywords:** Toxicity, single dose, local Tolerance, meningococcal B vaccine, rats