

Evaluación de la toxicidad por dosis única de la vacuna antitetánica vax-TET[®] en ratas Sprague Dawley

Yulicé López, Sergio Sifontes, Juan F. Infante, Daiyana Díaz, Mónica Obaya, Eligio Sosa, Viviana Pérez, Tamara Hernández, Yolanda Valdés, Adriana Ponce, Niurka Rodríguez, Jorge Luis Prieto, Julio Silega.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. A.P.16017, C.P.11600.
La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correo electrónico: ylferia@finlay.edu.cu

La vacuna vax-TET[®] está indicada en la prevención del tétanos y es efectiva si se logra un completo y apropiado esquema de inmunización. Para investigar el potencial tóxico de este producto se realizó una prueba toxicológica con una dosis única, por vía intramuscular, en un volumen de 0,2 mL en ratas Sprague Dawley. La composición de la vacuna de ensayo probada fue la misma de la vacuna comercial. Los animales fueron observados diariamente en busca de síntomas locales y sistémicos de toxicidad. Se realizaron mediciones del consumo de agua y alimento, así como del peso corporal. Dos semanas después de la inoculación las ratas fueron sacrificadas por métodos de eutanasia sin dolor y sometidas a necropsia. No se observaron muertes ni síntomas de toxicidad en los animales estudiados. Tampoco se encontraron diferencias de interés toxicológico entre los grupos experimentales en cuanto a las variables medidas. El estudio anatomopatológico reveló la presencia de formaciones granulomatosas de tipo macrofágico asociadas, fundamentalmente, al hidróxido de aluminio. Estos resultados permitieron concluir que, bajo las condiciones del estudio y según los criterios establecidos, esta vacuna no produce efectos adversos en el modelo animal usado, por lo que se considera potencialmente no tóxica para humanos.

Palabras clave: Toxicología, dosis única, tétanos, toxoide, vacuna, rata, Sprague Dawley.

Introducción

Se conoce que la población más afectada por enfermedades inmunoprevenibles es la menor de un año, teniendo como consecuencia altas tasas de mortalidad y diversas secuelas permanentes. El tétanos ha constituido siempre una enfermedad de alta incidencia en países pobres, cuyo agente causal es el *Clostridium tetani*, el cual está presente en el medio ambiente. Es por ello que la ciencia se ha encargado de solucionar este problema con el desarrollo de diferentes tipos de vacunas a fin de combatir y prevenir la enfermedad (1, 2). La vacunación es la estrategia más importante desde el punto de vista del costo-beneficio en materia de prevención, teniendo en cuenta que la aplicación del esquema vacunal, es la atención en salud más eficaz para prevenir la carga, por enfermedad, muerte y discapacidad que ocasionan las enfermedades inmunoprevenibles (3).

La vacuna antitetánica vax-TET[®], producida por el Instituto Finlay, es obtenida a partir de cultivos de *Clostridium tetani*, destoxificada con formaldehído-calor y purificada por métodos físicos-químicos y la toxina detoxificada o anatoxina tetánica y finalmente es adsorbida en gel de hidróxido de aluminio.

Las vacunas que contienen hidróxido de aluminio como adyuvante y tiomersal como preservante pueden producir, además de las reacciones adversas asociadas a los antígenos,

dolor local, eritema, reacciones alérgicas, entre otros síntomas (1).

Para analizar el potencial tóxico de este producto se realizó un estudio de toxicidad por dosis única como parte de los ensayos preclínicos propuestos para avalar la calidad y seguridad de este producto. El objetivo final del presente estudio fue evaluar la toxicidad que pudiera generar el producto vacunal completo o sus componentes por separado con solo una dosis de esta sustancia.

Materiales y Métodos

Animales: Se usaron ratas Sprague Dawley de ambos sexos, de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal entre 150-200 g, las cuales fueron suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio de Cuba (CENPALAB). Los animales fueron colocados según el sexo, en cajas de policarbonato tipo-IV (superficie de piso 1800 cm²) a razón de 5 por caja. Se realizó una cuarentena de siete días antes del comienzo del experimento. El material de encamado fue bagazo de caña de azúcar, suministrado por el CENPALAB y esterilizado en autoclave (121 °C, 20 min, 1,5 Kg/cm²) (4). El encamado se cambió dos veces por semana. Se suministró pienso paletizado propio para ratas (suministrado y certificado por el CENPALAB) y agua fresca *ad libitum*. Los locales donde se alojaron mantuvieron 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. Todos los procedimientos cumplieron con lo establecido por el Comité de Ética institucional vigente (5, 6, 7).

Diseño experimental: El estudio de dosis única tiene una duración de 21 días, incluyendo la semana de adaptación. El esquema de tratamiento a evaluar incluyó 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 descrito para la aplicación en esta especie en el área muscular del cuadriceps femoral y el semitendinoso de las ratas de esta categoría por vía intramuscular en un solo punto (0,2 mL) (8). Este nivel de dosis ofrece un margen de seguridad satisfactorio, teniendo en cuenta el peso promedio del humano con respecto al del biomodelo utilizado.

Tabla 1: Diseño de los grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento	Número de animales por sexo
I	Control no inoculado	10
II	Placebo	10
III	Anatoxina Tetánica	10
IV	Vacuna (vax-TET®)	10

Durante el periodo de evaluación y registro de los datos no se tuvo conocimiento del tratamiento recibido por cada animal, lo que permitió realizar el estudio a doble ciegas.

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 calculó 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. Igualmente se hizo para el consumo de agua. 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 y al sitio de inoculación propiamente dicho (músculo y ganglio linfático poplíteo correspondiente). 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: Se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas con tres factores (tratamiento, sexo y tiempo).

Consumo de agua y alimento: Para realizar el análisis estadístico de estas dos variables se hicieron grupos de observaciones en el tiempo. Estos grupos de valores se correspondieron aproximadamente con las semanas postinoculación. Se comparó el consumo mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento, sexo y 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 (8). 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 dado seguramente por la baja toxicidad de la vacuna antitetánica ampliamente conocida (9).

Peso Corporal: Todos los animales incrementaron su peso corporal ($P < 0,001$) durante los 14 días posteriores a la inoculación (Figura 1). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($P > 0,1$) y los machos mostraron un aumento de peso más acelerado que las hembras ($P < 0,001$). Las curvas de crecimiento de los animales se correspondieron con las observadas en ensayos anteriores en nuestras instalaciones (10).

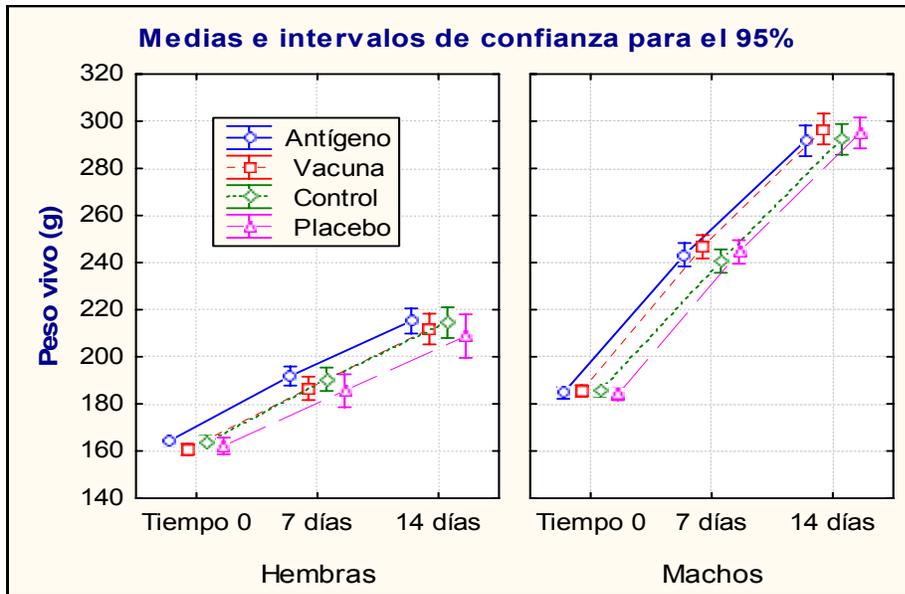


Figura 1. Peso vivo promedio (g) de las ratas después del tratamiento.

Consumo de Alimentos: El consumo de alimentos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamientos $P > 0,1$ (Figura 2). Los machos consumieron más que las hembras ($P < 0,001$) y no hubo interacción significativa entre los sexos y los tratamientos ($P > 0,5$). La media de todos los grupos fue de 18,6–19,6 g para las hembras y de 25,6–26,4 g para los machos, lo cual coincide con las medias históricas de los animales de esta línea y

categoría en nuestras instalaciones (10 y 11). **Consumo de Agua:** El consumo de agua no mostró diferencias estadísticas ($P > 0,1$) entre los distintos grupos experimentales (Figura 3). En general, los machos consumieron más que las hembras ($P < 0,01$) siendo de 44–46 mL para los primeros y de 32–35 mL para las hembras, correspondiéndose con los valores observados para las ratas de esta categoría en nuestras instalaciones (10, 11).

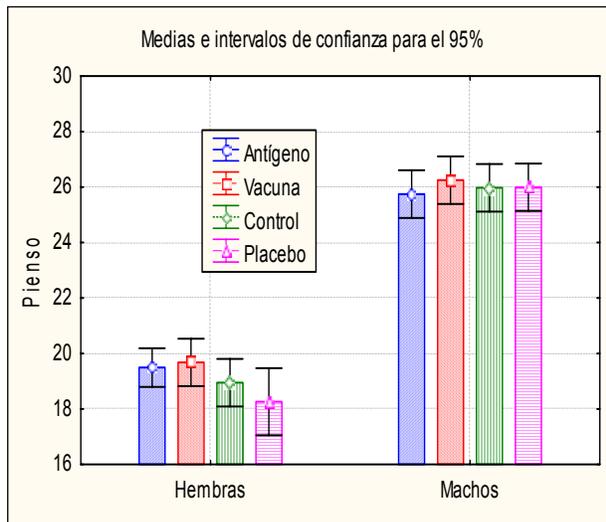


Figura 2. Consumo promedio de alimento (g) de las ratas según tratamiento y sexo.

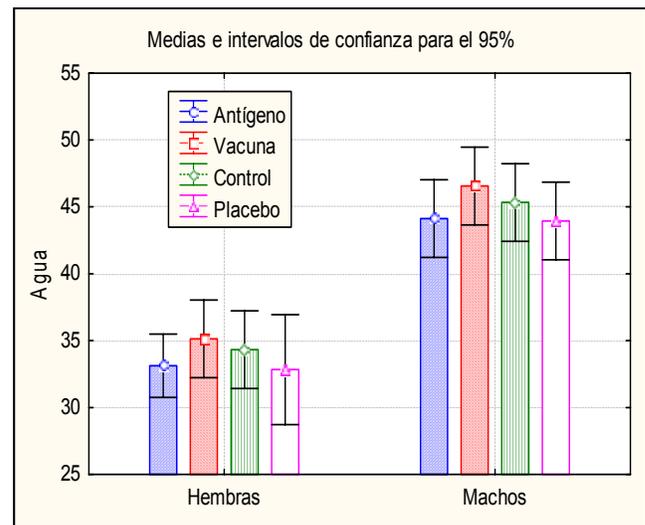


Figura 3. Consumo promedio de agua (mL) de las ratas según tratamiento y sexo.

Estudio anatomopatológico: De forma macroscópica, solo se observaron granulomas en el sitio de inoculación de los grupos vacunados y el placebo. El análisis histopatológico (Tabla 2 y Figura 4) también reveló la presencia de formaciones granulomatosas macrofágicas en el sitio de inoculación. Estas lesiones se presentaron con una

frecuencia similar en los grupos tratados con la vacuna o el placebo no así en los controles (sin tratamiento), por lo que se considera que están relacionadas con el adyuvante. Este tipo de lesiones ha sido descrito con anterioridad para otras vacunas que contienen compuestos de aluminio como adyuvante (12, 13).

Tabla 2. Frecuencia de aparición de las lesiones durante el estudio anatomopatológico.

Tratamientos	Músculo				Total (%)
	Hembras		Machos		
	N	%	N	%	
Vacuna	2	5	1	2,5	3,8
Placebo	3	7,5	0	0	3,8
Control	0	0	0	0	0

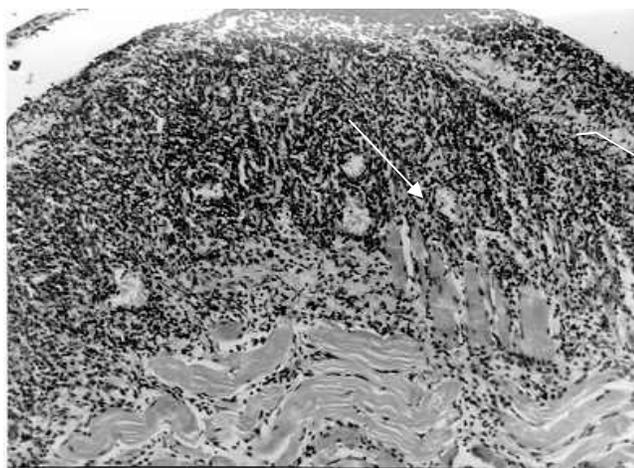


Figura 4. Músculo de una hembra Sprague Dawley del grupo placebo. (H.E X 80).

Durante el ensayo no se observaron muertes ni se registraron síntomas que indicaran toxicidad local ni sistémica. El peso vivo de los animales, así como el consumo de agua y los alimentos no mostraron diferencias entre grupos de tratamientos que indicaran toxicidad del producto probado y las alteraciones anatomopatológicas observadas se correspondieron con las descritas para el hidróxido de aluminio empleado como adyuvante (14). Por lo tanto podemos concluir que bajo las condiciones del estudio y según los criterios establecidos, el candidato vacunal en estudio no produce efectos adversos que comprometan la salud del modelo animal usado, por lo que se considera potencialmente no tóxica al ser administrada por vía intramuscular con estos niveles de dosis.

Referencias

1. 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). Enero, 1989 y 1998.
2. Freireich EJ. Cancer Chemother Reports 1966; 50(4):219-44.
3. Servicio de Salud Colombia, República de Colombia, Ministerio de Salud. Acuerdo Número 193 de 2001, Consejo Nacional de Seguridad Social de Salud, Diario Oficial No. 44.427, 19 de Mayo de 2001.
4. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Resolución Ministerial No. 152/92. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de Calidad en Ensayos Toxicológicos.
5. 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.
6. Canadian Council on Animal Care. CCAC *guidelines on: antibody production*, 2002.
7. Buenas Prácticas de Laboratorio. Cuban Standard NC-212; 1992.
8. [StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com]. (2003).
9. Miranda AR, Sánchez R, Góngora W, Mulet O. Obtención de sueros hiperinmunes de origen equino antitoxina tetánica, utilizando adyuvante oleoso. Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín. Correo Científico Médico de Holguín, 2006;10(3)
10. Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E. y otros. Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL® en ratas Sprague Dawley. VaccinMonitor 2004; 13 (2):11-6.

11. Instituto Finlay. Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Preclínica. Ensayo de Toxicidad por Dosis única de la Vacuna DT-Poli Vi en ratas Sprague Dawley. [Informe Técnico de Ensayo Preclínico], 2003.
12. 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.
13. Agencia Europea para la Evaluación de Productos de Medicina (EMA). Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines, 1997.
14. Aguilar JC, Leal M de J. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biocología Aplicada* 2000;17(3):147-160.

Evaluation of toxicity by single dose of the tetanus vaccine vax-TET[®] in Sprague Dawley rats

Abstract

The tetanus vaccine vax-TET[®] is indicated for the prevention of tetanus and it is effective if a complete and adequate immunization scheme is achieved. In order to investigate the toxic potential of this product, a toxicological test at single dose (0,2 ml), by intramuscular route was developed in Sprague Dawley rats using the same substance concentrations suggested by the manufacturer. The animals were daily observed looking for local and systemic symptoms of toxicity. Water and food consumption and body weight were also monitored during the experiment. Two weeks after inoculation, rats were slaughtered and submitted to necropsy studies. No deaths or toxicity symptoms were observed in the animals studied. No differences of toxicological interest were found among experimental groups regarding the variables measured. The anatomic-pathological study showed the presence of granulomatous formations mainly associated to aluminium hydroxide in the formulation. It was concluded that under the study conditions and following the established criteria, this vaccine does not produce any adverse reactions in the animal model used, suggesting a low potential toxicity in humans.

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

Recibido: Noviembre de 2007

Aprobado: Diciembre de 2007