

Ensayo de inmunogenicidad y toxicidad local del cocleato de *Neisseria meningitidis* en ratas Sprague Dawley

Juan F. Infante, Sergio Sifontes, Viviana Pérez, Gustavo Bracho, Tamara Hernández, Caridad Zayas, Yulíee López, Daiyana Díaz, Reynaldo Acevedo, Niurka Rodríguez, Miriam Lastre, Mildrey Fariñas, Yudith Del Campo, Adriana Ponce, Oliver Pérez

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

email: jinfante@finlay.edu.cu

Los estudios de tolerancia local para productos vacunales resultan fundamentales como requisitos regulatorios para los estudios preclínicos. En este ensayo se utilizaron 48 ratas Sprague Dawley, de ambos sexos, con un peso corporal de 180-220 g, suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, y una duración de 17 días. Las ratas fueron distribuidas en 5 grupos: 3 con diferentes concentraciones de cocleatos, uno sin inocular y otro que recibió el diluyente del producto en prueba. A estas se les realizaron las observaciones clínicas necesarias, tales como: mediciones de incremento de peso, consumo de alimentos y agua, así como la evaluación anatomopatológica en los dos tiempos de sacrificio, uno a los 12 y otro a los 17 días; se enfatizó en el estudio histopatológico de encéfalo y las fosas nasales en tres niveles de su extensión. Se hicieron investigaciones inmunológicas consistentes en la determinación de IgG en suero, saliva y líquido cefalorraquídeo. Los resultados arrojaron un incremento del peso. En el consumo de agua y alimento no se observaron alteraciones clínicas, la anatomopatología evidenció discretos cambios inflamatorios que guardaron una relación directa con el aumento de las concentraciones del producto, los títulos de IgG en la saliva y suero de las ratas inoculadas con los cocleatos difirieron de forma significativa ($P < 0,05$) respecto a los grupos controles, el líquido cefalorraquídeo resultó negativo a la presencia de anticuerpos específicos IgG. Se concluye que los cocleatos aplicados por esta vía en ratas resultaron inmunogénicos e inoocuos para el referido producto.

Palabras clave: Toxicidad, tolerancia local, cocleatos, ratas.

Introducción

Los estudios de tolerancia local para los productos vacunales constituyen un eslabón fundamental en la cadena de requisitos regulatorios de los estudios preclínicos toxicológicos, sobre todo si se tiene en cuenta que la utilización de la vía de las mucosas parece ser una tendencia actual por las ventajas que esta ofrece, sin embargo, hay escasa información sobre el uso de estos estudios para evaluar la vía intranasal en vacunas.

Como es conocido, por la vía de la mucosa nasal se incorporan al organismo múltiples antígenos que atraviesan las barreras naturales y penetran en el organismo desencadenando una respuesta inmune, la cual debe ser bien estudiada, sobre todo en el caso de utilizar un preparado vacunal que se incorporará al organismo en una zona tan cercana al sistema nervioso central.

Debemos tener en cuenta los últimos reportes de la literatura donde se relacionan eventos adversos al utilizar esta vía de inoculación para preparados vacunales que han ocasionado procesos patológicos de significación epidemiológica, como es el llamado Síndrome de Bell, caracterizados por parálisis facial.

Los cocleatos son estructuras lipídicas altamente estables que han sido reportadas como buenos sistemas de liberación

de antígenos y buenos adyuvantes para una amplia gama de vacunas parenterales y mucosales.

La principal importancia del sistema inmune mucosal es que este constituye la primera barrera defensiva con la cual el individuo combate numerosos patógenos que acceden al organismo colonizando los tractos gastrointestinales y respiratorios después de la ingestión o la inhalación de los mismos (1).

La vacunación mucosal ofrece varias ventajas sobre las aplicadas por la vía parenteral, pues en primer lugar, induce una respuesta inmune local antimicrobial específica y de esta forma bloquea la puerta de entrada del patógeno, incrementando la eficacia de la vacuna. Segundo, evita el trauma producido por la inyección, la cual puede incrementar las complicaciones. Tercero, pudiera facilitar la aplicación de la vacuna especialmente en países pobres, además, el empleo de este método de inmunización mucosal disminuye el riesgo de la transmisión de agentes infecciosos a través de las jeringuillas contaminadas (2,3).

La administración mucosal por la vía intranasal de un producto con efectos adyuvantes vacunales ha sido muy poco explorada desde el punto de vista toxicológico preclínico. El hecho de que solo dos capas de células separen el lumen de la cavidad nasal de una rica red vascular en la lámina propia

hace a la mucosa nasal vulnerable a los efectos adversos de una formulación administrada por esta vía.

El objetivo del presente trabajo fue la realización de un estudio de tolerancia local por la vía nasal que permitiera la evaluación de los posibles efectos adversos provocados por el producto cocleato (AFCo1), a la vez conocer la posible existencia de los títulos de anticuerpos IgG AFCo1, obtenidos a partir del proteoliposoma (PL) de *Neisseria meningitidis B*, en saliva y suero, así como la relación entre estos y los posibles procesos inflamatorios a nivel de las fosas nasales de los animales que recibieron el producto.

Materiales y Métodos

El diseño experimental contempló la inoculación intranasal de ratas Sprague Dawley y su sacrificio en diferentes tiempos postinoculación, para estudiar el posible desarrollo de lesiones y conocer si el producto resulta inmunogénico en el modelo animal seleccionado. Este se basó fundamentalmente en la información recopilada de la Regulación No. 39/04, MINSAP, las Pautas de la OECD para la Evaluaciones de Fármacos, los Estándares de Medicamentos de la Comunidad Europea y las Normas de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (4-6).

El protocolo de estudio fue analizado y aprobado por la comisión institucional de ética para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se usaron ratas Sprague Dawley con un peso corporal de 180-220 g, de ambos sexos. Los mismos fueron suministrados por el Centro de producción para Animales de Laboratorio (CENPALAB), acompañados de sus certificados de calidad sanitaria y genética.

Los animales fueron alojados en cajas T4 (área de piso: 1800 cm²) de policarbonato (Tecniplast, Italia). Se empleó encamado de bagazo de caña desmenuzado y esterilizado en autoclave durante 15 min. Este se cambió dos veces por semana. La alimentación consistió en pienso especializado para ratas, suministrado y certificado por el CENPALAB.

Los locales donde se realizó el ensayo mantuvieron una temperatura de 20-25 °C y una humedad relativa de 60-65%. Estos parámetros ambientales se registraron dos veces al día durante el estudio. Se mantuvo un ciclo de iluminación de 10 h/luz – 14 h/oscuridad. A las muestras tomadas para los estudios histopatológicos se colocó una tarjeta rotulada con un lápiz de grafito indicando el sexo, el número del animal y el tiempo de muestreo en los depósitos apropiados a este efecto.

Los frascos estuvieron identificados con el código del ensayo y la fecha de muestreo escritos en tinta.

Procedimiento experimental

El estudio de tolerancia local tuvo una duración de 17 días. En la Tabla 1 se resumen los grupos tratamientos, el número

de animales por grupo, sexo y tiempo de sacrificio (48 ratas en total):

Tabla 1. Diseño experimental de los grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento- /Dosis	Volumen/Tiempo de aplicación a los 0,5 y 10 días	Tiempo de sacrificio y No. de animales por sexo			
			12 días		17 días	
CN	Control negativo	-	M	H	M	H
C-1	AFCo1 50 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
C-2	AFCo1 100 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
C-3	AFCo1 200 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
PBS	Control (diluyente)	20 µL P/F	3	3	3	3

AFCo1: Cocleato

P/F por cada fosa nasal.

PBS: Amortiguador fosfato salino

A todos los animales, excepto a los del grupo control negativo, se les realizaron tres inoculaciones durante los días 0, 5 y 10; se aplicaron 20 µL en cada fosa nasal, en tres concentraciones del producto en ensayo y al grupo con diluyente se aplicó el mismo volumen.

Se realizó la exploración clínica de los animales dos veces al día durante las primeras 72 h y luego diariamente, prestando especial atención a la manifestación de los síntomas siguientes: piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación/depresión, incoordinación, tos, secreción a través de las fosas nasales y dificultad respiratoria. Igualmente, se registró cualquier otro síntoma observado. Se realizaron pesajes a todos los animales los días 1, 12 y 17.

El agua fue suministrada *ad libitum*; para ello se depositaron 750 mL de agua en el frasco colocado a la caja de ratas, no obstante, se registró el volumen consumido. En días alternos se midieron, según la propia graduación del frasco, el remanente de agua y se calculó, por diferencia, el volumen consumido por el grupo.

Cuando se realizaron las mediciones se enrasaron nuevamente los frascos con 750 mL de agua. Para obtener un cálculo aproximado del consumo medio diario por animal se dividió el consumo del grupo entre el número de animales de la caja y el número de días transcurridos entre mediciones.

Al inicio y cada vez que se hizo una medición se completó en las tolvas de las cajas 500 g de pienso. Con ayuda de una balanza técnica se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, de la misma forma que se describió para el agua.

Los días 12 y 17, después de la aplicación del último tratamiento, fueron sacrificados animales para estudios anatomopatológicos según se indica en la Tabla 1. El mismo

se realizó por administración de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/kg).

Se examinaron todos los órganos y se tomaron muestras de la cavidad nasal y del encéfalo. Asimismo, se muestrearon aquellos órganos que presentaron alguna alteración al análisis macroscópico.

Para tomar las muestras de la cavidad nasal se procedió de la forma siguiente: primero se retiró la piel y el tejido celular subcutáneo que recubría el referido órgano, luego se realizaron cortes transversales a tres niveles; también se tomaron muestras del encéfalo, luego de ser extraído de la cavidad craneal seccionando el mismo con un corte longitudinal y tomando una sección para el estudio histopatológico.

Las muestras de los tejidos fueron colocadas en pequeñas cajas plásticas permeables al fijador, donde permanecieron durante las primeras 24 h con formaldehído al 10%, y se neutralizó con carbonato de calcio. Luego se redujo la concentración del fijador al 5% hasta su inclusión en parafina. Los cortes se realizaron con un micrótopo de cortes en serie Leyca 1400, donde se tomaron tres secciones con tres repeticiones en la zona proximal, media y distal de la cavidad nasal. Estos tuvieron un espesor de 4-6 μm .

La dirección y el número de secciones se realizaron según las recomendaciones de la Comunidad Económica Europea (CEE) para la evaluación de productos tóxicos.

El día 17, previo al sacrificio, se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) para lo que se utilizó un equipo de inyección hipocraneal No. 27 para determinar la posible presencia de inmunoglobulina específica en este fluido; la sangre para los estudios inmunológicos fue obtenida mediante el corte de la vena axilar.

Los LCR y los sueros fueron congelados para realizar las determinaciones de IgG anti PL (antiproteoliposoma). Se realizó la recolección de saliva el día 7 postinoculación mediante la aplicación de pilocarpina por vía intraperitoneal. La misma fue recolectada en microtubos de 1,5 mL.

La técnica de ELISA fue realizada en placas de 96 pozos de alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc, EUA) que se cubrieron con una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PL diluido en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 11 mM, NaHCO_3 35 mM (pH 9,6)). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato 0,15 M (pH 7.2) (SSTF).

Luego de bloquear con solución de bloqueo (seroalbúmina bovina (SAB) al 1% (p/v) en SSTF) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,4). El suero de referencia y los sueros a evaluar se diluyeron

1:200 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v). Se aplicaron 100 μL /pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia. Las placas se incubaron a 37 °C por 2 h, luego se lavaron cuatro veces con SSTF. Se adicionaron 100 μL /pozo de anti-IgG de rata conjugado a peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20, 0,1% (v/v), durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda.

Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con solución de lavado, se adicionaron 100 μL /pozo de una solución de peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno *ortho*-fenilendiamina (OPD) 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na_2HPO_4 52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min.

La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL de una solución de H_2SO_4 2 M. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus).

Para el procesamiento estadístico de los datos de los pesos corporales se utilizó un análisis de covarianza con mediciones repetidas con tres factores: tratamiento, sexo, tiempo. A consecuencia del sacrificio seriado el tamaño de la muestra (N) se redujo progresivamente desde 25 hasta 5.

Para realizar el análisis estadístico de las variables agua y alimentos se realizaron observaciones en el tiempo. El objetivo de este proceder fue evitar un incremento innecesario del error experimental. Se compararon los consumos mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x sexo x tiempo). En caso de aparecer lesiones, sus frecuencias se compararon entre grupos mediante la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher.

Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico Statistica 5.1D (StatSoft, Inc. 1996. Statistica for Windows. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104.

Resultados y Discusión

No se observaron síntomas clínicos tales como secreciones nasales, dificultad respiratoria, ni otras que evidenciaran compromiso del sistema respiratorio o nervioso. Mientras que el comportamiento de las ratas en general fue el esperado para esta especie, línea y edad.

El análisis estadístico de los consumos de agua y los alimentos de las ratas durante los distintos momentos en que fue medido arrojó un incremento constante y paulatino de estos (Figuras 1, 2, 3), así como no se detectaron diferencias estadísticas que no fueran las esperadas entre sexos, dadas las diferencias fisiológicas conocidas entre estos, dichos resultados fueron similares a los obtenidos (7, 8) cuando se realizaron estudios de toxicidad a productos vacunales similares.

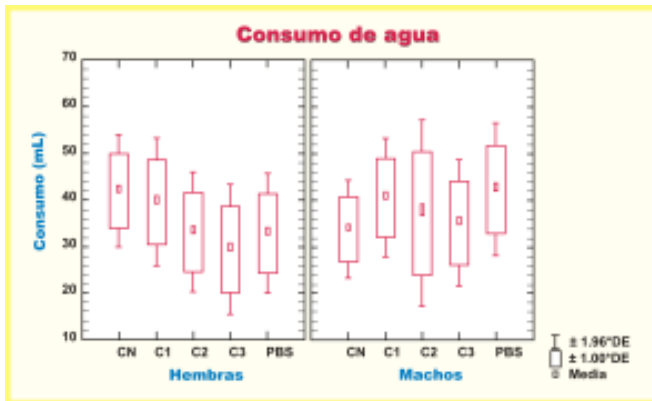


Figura 1. Consumo de agua hasta los 7 días postinoculación.

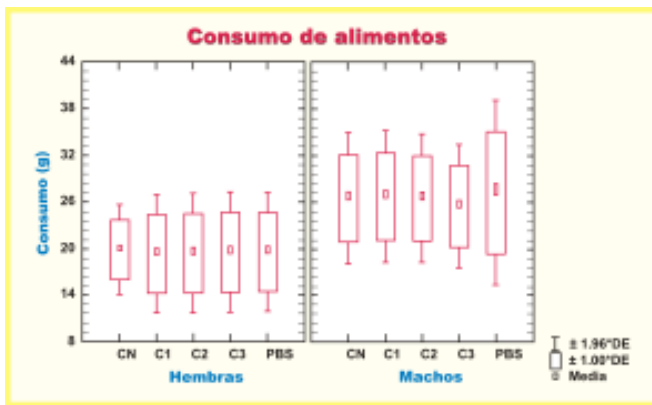


Figura 2. Consumo de alimentos hasta los 7 días postinoculación.

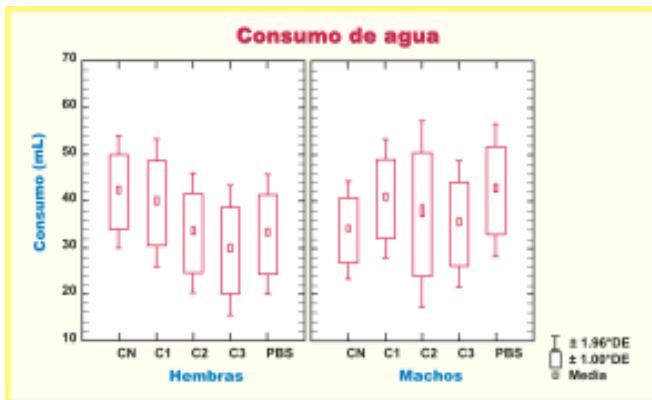


Figura 3: Consumo de agua hasta los 14 días postinoculación.

El análisis estadístico de los pesos durante los distintos momentos en que fueron medidos no detectó diferencias estadísticas que no fueran las esperadas según sexo (Figuras 4 y 5). Coincidiendo con los resultados obtenidos en otros estudios de toxicidad de productos afines conducidos en ratas de la línea Sprague Dawley, en condiciones de tenencia y manejo similares (9, 10).



Figura 4: Peso vivo 7 días después de la inoculación.

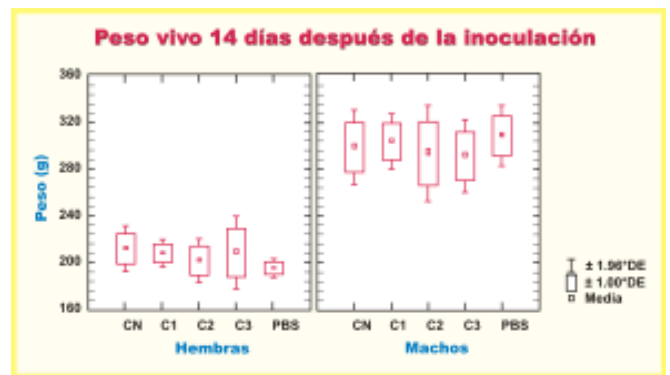


Figura 5: Peso vivo a los 14 días después de la inoculación.

Los resultados inmunológicos demostraron la ausencia de IgG a nivel del LCR, lo cual pudiera contribuir a la limitación que sufre la sustancia de ensayo en la zona de los cornetes nasales, sin embargo, encontramos la presencia de IgG anti PL, tanto en saliva a los 7 días como en suero a los 21 días en animales inmunizados con el cocleato que mostraron diferencias estadísticas con relación al grupo control negativo. (Figuras 6 y 7).

De esta forma nuestros resultados coinciden con Lycke (11), cuando plantea que los cocleatos y los PL aplicados por la vía intranasal son una eficaz estrategia para estimular la inmunidad, tanto de forma sistémica como local.

Además, demostramos que en ratas también se estimula una fuerte respuesta mucosal, sistémica de IgG y de inmunidad mediada por células (12), lo que ha sido reportado en los animales utilizados en otros ensayos realizados en la especie ratón y en humanos (13-17).

No se observó relación dosis-efecto en los títulos de anticuerpos entre los grupos inoculados con diferentes concentraciones del producto cocleato.

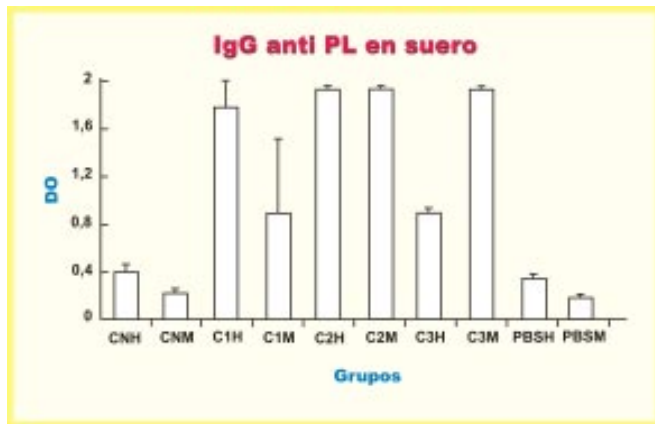


Figura 6: Comparación de los niveles IgG anti PL en suero entre los diferentes grupos experimentales

Leyenda: H: Hembra; M: Macho.

Ninguno de los animales en el ensayo mostró alteraciones anatomopatológicas macroscópicas.

No obstante, las muestras de tejido del sitio de inoculación investigadas histopatológicamente a tres niveles de las fosas nasales, demostraron que los animales del grupo control y el placebo presentaron discretos focos de inflamación con escasa significación patológica, mientras que en los grupos experimentales se demostró la presencia de procesos inflamatorios de tipo agudo con presencia de polimorfos nucleares neutrófilos que se situaban a nivel de la lámina propia, fundamentalmente en la zona media y posterior de las fosas nasales, con cierto incremento de su presentación que dependía del aumento en la concentración de los cocleatos (Tabla 2 y Figura 8), así como algunos agregados linfoides que se encontraron a nivel de dicha lámina.

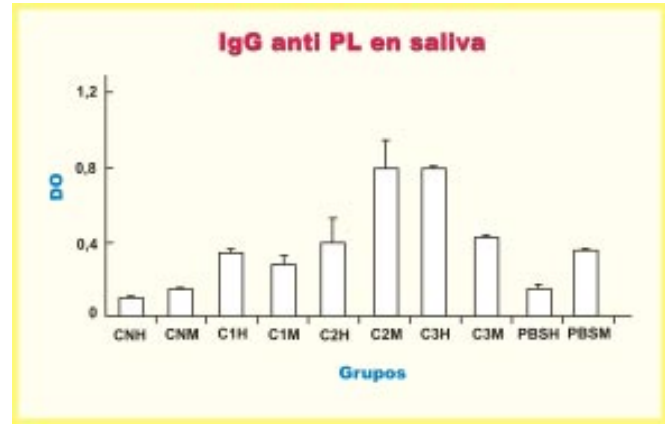


Figura 7. Comparación de los niveles IgG anti PL en saliva.

Leyenda: H: Hembra; M: Macho.

Los estudios microscópicos del sistema nervioso central no mostraron alteraciones que evidenciaran compromiso de este debido a la utilización del producto. La presencia de agregados linfoides focales o difusos en este tejido pudiera obedecer a que en la lámina propia de la mucosa existen poblaciones mixtas de linfocitos (fundamentalmente Linfocitos T CD₄⁺ y células B) que exhiben un fenotipo de células activadas como consecuencia de su estimulación en la inmunidad mucosal, por lo que su presencia forma parte de la anatomía funcional de este tejido ante una estimulación antigénica (18-21).

Nuestros resultados evidenciaron la ausencia de muertes o síntomas que indiquen toxicidad local o sistémica. El peso vivo, el consumo de agua y alimentos no mostraron diferencias entre los grupos de tratamiento que indicaran toxicidad del producto.

Tabla 2. Lesiones histopatológicas en las ratas de ambos sexos inoculadas con diferentes concentraciones de cocleatos y sus controles.

Grupo	Tratamiento	12 días						17 días						Total	
		Machos			Hembras			Machos			Hembras				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
CN	Control	-	-	-	+M	+M	-	-	-	-	-	-	-	-	2
C1	AFCo1 50 µg	-	-	+P	-	-	-	+P	+P	-	-	-	-	-	3
C2	AFCo1 100 µg	-	-	-	-	-	+MP	++-P	-	+P	-	+P	+P	-	5
C3	AFCo1 200 µg	++MP	+M	-	-	-	-	+P	+MP	++MP	-	-	-	-	5
PBS	Diluyente	-	+MP	-	-	+M	-	-	-	-	-	-	-	-	2

M: Parte media +: Leve
P: parte posterior ++: Moderada

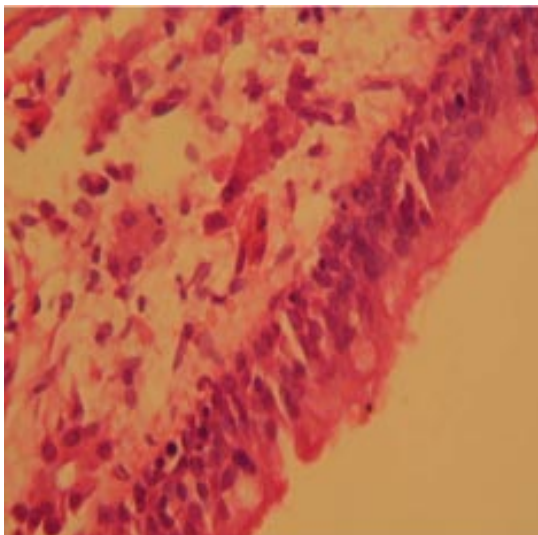


Figura 8. Proceso inflamatorio agudo con la presencia de células polimorfonucleares neutrófilos en la lámina propia de la mucosa a nivel de un cornete nasal del corte de la zona posterior, perteneciente a un animal inoculado con una concentración de 200 μg de cocleatos.

Tampoco se observaron lesiones anatomopatológicas de interés toxicológico, aunque se observó una reacción inflamatoria considerada leve a nivel de la lámina propia de la mucosa de las fosas nasales que aumentó en dependencia de la concentración de la sustancia en ensayo.

La observación de una respuesta de anticuerpos específicos, tanto en sangre como en saliva, demostró la presencia de una respuesta inmune, lo que indica su relevancia como modelo animal para este ensayo.

Bajo las condiciones de este estudio y según los criterios establecidos para la evaluación de estos resultados se concluye que los cocleatos no provocaron toxicidad local ni sistémica y sí una respuesta inmune adecuada, al ser inoculados por vía de intranasal.

Referencias

1. Del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gil D, Zayas C, et al. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants. *Vaccine* 2006; 24(S2): 250-1.
2. Dicko M, Oni AQ, Gavinet S, Kone S, Perre L, Jacques B. Safety of immunization injection in Africa: not simply problem of logistics. *Bull WHO* 2007; 78:163-9.
3. Baudner BC, Balland O, Guilian MN, Von Hoegen P, Rappulolir, Betbeder D, et al. Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. *Infect Immun* 2002;70:4785-90.
4. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (AR). Las nuevas vacunas y los aspectos regulatorios. *Boletín para Profesionales ANMAT* 1999; 7(4):61-2.
5. Comisión de las Comunidades Europeas. Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano”: Directrices Farmacotoxicológicas. Volumen III. En: Normas sobre medicamentos de la Comunidad Europea. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas; 1998. [No. 2, sec. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE].
6. MINSAP. Regulación 39/04, Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental. Buro Regulatorio para la Protección de la Salud Humana. MINSAP; 2007.
7. Infante JF, Sifontes S, González P, Muñoz E, Martínez A, Fariñas M, et al. Toxicidad de VA-DIFTET por administración a dosis repetida en ratones. *VacciMonitor* 2005; 10(2):13-8.
8. Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E, et al. Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2004;13(2):11-6.
9. Sosa E, Sifontes S, Infante JF, Díaz D, López Y, Pérez V, et al. Estudio de tolerancia local de la vacuna vax-TyVi en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2005; 14(1):21-7.
10. López Y, Sifontes S, Infante JF, Díaz D, Obaya M, Alvarez E, et al. Evaluación de la toxicidad por dosis única de la vacuna antidiftérica-antitetánica en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2005; 14(2):1-6.
11. Lycke N. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector: CTA1-DD/ISCOM. *Cell Microbiol* 2004; 6 (1):23-32.
12. Gizurason S, Georgsson G, Aggerbeck H, Thorarinsdóttir H, Heron I. Evaluation of local toxicity after repeated intranasal vaccination of guinea pigs. *Toxicology* 1996; 107:61-8.
13. Finn-Eirik Johansen, Espen S. Baekkevold, Hege S Carlsen, Inger Nina Farstad, Dulce Soler, and Per Brandtzaeg. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and

- mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood* 2005; 106(2):503-600.
14. Holmgren J, Czerkinsky, C K Eriksson, A Harandi. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 2003; 21(Suppl 2):89-95.
 15. McGhee J R, Kiyono H. Mucosal immunology. W. E. Paul, ed. *Fundamental Immunology* 909. 1998. Academic Press, San Diego.
 16. McGhee J R, Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect. Agents Dis* 1993; 2:55-9.
 17. Brandtzaeg, P. Basic mechanisms of mucosal immunity—a major adaptive defense system. *Immunologist* 1995; 3:89-96.
 18. Martin E, Nicolas GM. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 29:13-8.
 19. Zeitlin P, Boyle P, Guggino W, Molina L. A Phase I Trial of Intranasal Moli1901 for Cystic Fibrosis American College of Chest Physiocians 2004; 125:143-9.
 20. Kuck D, Lau T, Leuchs B, Kern A, Müller M, Gissmann L, Kleinschmidt J, Intranasal Vaccination with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 5 against Human Papillomavirus Type 16 L1. *Journal of Virology* 2006; 80:2621-30.
 21. Rigano M, Sala F, Arntzen C, Walmsley J M. Targeting of plant-derived vaccine antigens to immunoresponsive mucosal sites. *Vaccine* 2003;21:809-11.

Study of immunogenicity and local toxicity of the *Neisseria meningitidis* cochleate in Sprague Dawley rats

Abstract

Local Tolerance studies for vaccine products are a main link in the chain of Regulatory Requirements for toxicological preclinical studies. Mainly considering that the use of mucosal road seems to be a current tendency due to the advantages it offers. Sprague Dawley rats of both sexes weighing 100-120 g (reception weight) provided by CENPALAB with the corresponding certificates of sanitary and genetic quality were used in this test. Local tolerance study lasted 17 days. Rats were distributed in 5 groups (3 groups with different cochleate concentrations, one without inoculation and another one that received the diluents of the product in test. Measurement of weight increase, food and water consumption, as well as the anatomopathologic studies in the two times of sacrifice, at 12 and 17 days were performed. Main histopathological studies were carried out in brain and nasal nostrils in three levels of their extension (anterior, medium and posterior areas). In addition, immunological assays such as the determination of IgG in serum, saliva and cerebrospinal fluid (CSF) were carried out. Results showed a sustained weight increase. There were no clinical alterations during water and food consumption, while the existence of discreet acute inflammatory changes was found by anatomopathological studies, which were directly related to the increase of the product concentration. The presence of IgG antibodies in saliva and in sera of the rats inoculated with the cochleates showed significant differences ($P < 0.05$) compared to the non inoculated control group and to the animals inoculated with the diluent. CSF studies resulted negative regarding the presence of specific IgG antibodies. The existence of a direct relation among the concentrations of the product in test and the inflammatory processes in the medium and posterior levels of the nasal nostril was proven, therefore it is considered that cochleates applied by this route and in the concentrations used are innocuous and immunogenic.

Keywords: Toxicity, local tolerance, cochleates, rats.

Recibido: Septiembre de 2008

Aceptado: Febrero de 2009