

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Toxicidad a dosis única de un candidato vacunal proteoliposómico contra *Leptospira spp* en el biomodelo *Mesocricetus auratus*.

Luis Alfredo Rosario Fernández, MSc^{1*}; Daniel Francisco Arencibia Arrebola, MSc^{2*}; Yolanda Emilia Suárez Fernández, PhD³; Juan Francisco Infante Bourzac, PhD²; Beatriz Tamargo Santos, MSc¹; Gustavo Sierra González, PhD²; Niurka Batista Santiesteban, MSc².

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL-U.H). Habana, Cuba.

² Instituto Finlay. Habana, Cuba.

³ Universidad Agraria de la Habana. Mayabeque, Cuba.

*Correspondencia a: Irosario@ifal.uh.cu, darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

La leptospirosis, es una de las zoonosis bacterianas más difundidas en el mundo. En la actualidad existen registradas varias vacunas de células enteras contra *Leptospira*. Estos productos biofarmacéuticos cuentan entre sus principales desventajas la falta de inmunoprotección cruzada contra los serovares no incluidos en la formulación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad a dosis única de un candidato vacunal proteoliposómico derivado de la membrana externa de *Leptospira spp*, en el biomodelo *Mesocricetus auratus*. El mismo fue evaluado a dosis única en ambos sexos del biomodelo por vía intramuscular. En el estudio no se observaron diferencias estadísticas de las variables: peso corporal, consumo de agua y alimentos respecto a los controles negativos. Tampoco se detectaron lesiones macroscópicas en órganos y tejidos de importancia toxicológica en los animales tratados con el candidato vacunal. En función de los resultados obtenidos se concluye que el candidato vacunal evaluado no fue potencialmente tóxico al ser administrado en dosis única por vía intramuscular en el biomodelo hámster Sirio.

Palabras claves: Toxicidad, dosis única, proteoliposoma, hámster Sirio, *Leptospira*.

Abstract

Single dose toxicity of a proteoliposome vaccine candidate against *Leptospira* spp in *Mesocricetus auratus* as biomodel.

Leptospirosis is the bacterial zoonosis more overspread in the world. As a control measure some whole cell vaccines has been developed and registered. These biopharmaceutical products have as principal disadvantages the absence of cross-protection against serovars not included on formulations and reactogenicity. In this paper it is discussed the toxicity at single dose of a proteoliposome vaccine candidate obtained from outer membrane cell wall of *Leptospira* spp using the *Mesocricetus auratus* as biomodel. The inoculation via intramuscular in both sexes did not show statistical differences among immunized and animal controls for the different variables: corporal weight, water and food intake. Neither macroscopic lesions of toxicological importance were observed. Agreement with these results, it can conclude that a single dose of the vaccine candidate immunized via intramuscular in *Mesocricetus auratus* did not show toxic potential.

Key words: Toxicity, single dose, proteoliposome, hamster Sirio, *Leptospira*.

Introducción

La leptospirosis, es una de las zoonosis bacterianas más difundidas en el mundo (OPS, 2005; OPS, 2009). El agente causal de esta enfermedad está descrito como bacterias delgadas y helicoidales, Gram negativas, con una activa motilidad pertenece a la familia Leptospiraceae, las cuales se agrupan en cuatro especies saprófitas y 12 patógenas, con alrededor de 250 serovares (Adler y De la Peña, 2009). Debido a las afecciones que produce en el hombre y los animales, así como por su repercusión económica en los países desarrollados y en vías de desarrollo, constituye una importante y permanente preocupación para la medicina humana y veterinaria (McBride y col., 2005; Levett y col., 2006).

En Cuba existe un programa de lucha contra la leptospirosis que incluye la vacunación profiláctica para humanos y animales con los productos vacunales vax-SPIRAL[®] y Polivalente-Leptospira de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (Labiofam) respectivamente. Estas vacunas son de células enteras inactivadas, con o sin adyuvante, que incluyen en sus formulaciones a los serovares de mayor circulación en el país (OPS, 2009). Estos productos biofarmacéuticos cuentan entre sus principales desventajas la falta de inmunoprotección cruzada contra los serovares no incluidos en la formulación y las reacciones de hipersensibilidad que generan en el receptor (McBride y col., 2005). Este hecho constituye un constante desafío para productores y comercializadores, así como para la evaluación de la eficacia de las mismas en nuevos mercados.

Para revertir esta situación, en la última década la comunidad científica ha desarrollado una amplia variedad de nuevas formulaciones vacunales basadas en las proteínas de membrana externa. Las cuales han demostrado ser una fuente atractiva como futuras candidatas vacunales debido a la homología y conservación entre los diferentes serovares lo cual genera en el hospedero protección cruzada (Cullen y col., 2004). En consonancia con estos hallazgos nuestro grupo de trabajo desarrolla un nuevo candidato vacunal contra *Leptospira*. La formulación de tipo proteoliposoma fue obtenida a partir de la membrana externa de la pared celular del serovar Canicola (Rosario y col., 2011; Tamargo y col., 2012). El mismo ha resultado ser muy inmunogénico y protector contra los principales serovares de interés epidemiológico en Cuba (Mozdok, Canicola, Copenhageni, Ballum). En el presente trabajo se evalúa la toxicidad a dosis única de este candidato vacunal contra *Leptospira spp* en el biomodelo *Mesocricetus auratus*.

Materiales y métodos

Animales. Fueron utilizados hámsteres Sirios (*Mesocricetus auratus*) de ambos sexos con una edad de 3-4 semanas y un peso vivo entre 49–55 g en ambos sexos. Los mismos fueron suministrados por el CENPALAB, acompañados de sus certificados de calidad sanitaria y genética. Se utilizó en este estudio la misma especie en la cual se evaluó la eficacia del candidato vacunal en estudio.

Condiciones de alojamiento, adaptación y aleatorización.

Los animales fueron alojados en cajas tipo T3 de policarbonato (Tecniplast, Italia). Cinco animales de un mismo sexo fueron colocados por cajas. Se empleó encamado de bagazo de caña desmenuzado suministrado por el CENPALAB y esterilizado en autoclave durante 25 minutos a 121 °C cambiándose dos veces por semana. Para alimentarlos, se les suministró pienso de roedores, todo propósito, esterilizable, que no requiere suplemento dietético: fórmula EMO1002, con número de lote 1181102, suministrado por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se suministro igualmente agua potable *ad libitum*. Los locales donde se mantuvieron los animales mantuvieron una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de $60 \pm 5\%$. Estos parámetros fueron diariamente registrados manteniendo un ciclo de luz/oscuridad de 12h.

Procedimiento Experimental

Grupos de tratamiento y vía de administración

Se realizaron evaluaciones clínicas a las 12h, 24 h y diariamente hasta los 14 días. En el ensayo se incluyeron animales no inmunizados que permitió no solo el control de las condiciones de inmunización, sino también de los posibles efectos adversos potenciales que pudieran desarrollarse en el curso del experimento. Se empleó la vía intramuscular por ser la propuesta para uso humano, en la región media posterior de la cara interna del muslo izquierdo, la misma se realizó en horas tempranas de la mañana, entre las 9:00 y las 11:00 a.m.

Estudio de Toxicidad por Dosis Única.

La dosis de vacuna propuesta para uso clínico en humanos es de 0,5 mL. El máximo permisible para hámster de esta talla y peso es un volumen de 0,2 mL. Teniendo en cuenta el peso y las relaciones alométricas entre el hombre y el modelo experimental utilizado, la dosis a aplicar (0,2 mL) permitió evaluar un margen de seguridad satisfactorio. Además se tuvo en cuenta que se administró el máximo volumen permisible teniendo en cuenta la especie, peso y vía de administración y que en los estudios de

inmunogenicidad se utilizó la dosis de 0,1 mL, siendo la dosis evaluada el doble de la terapéutica. El estudio de dosis única tuvo una duración de dos semanas (14 días). Se formaron 3 grupos de tratamiento.

El estudio de dosis única tuvo la finalidad de evaluar efectos adversos locales y sistémicos luego de la aplicación de una dosis del producto en prueba (Arencibia y col., 2009). A diferencia de los fármacos clásicos, en el caso de las vacunas no es preciso hacer un estudio de dosis efecto, en cambio se administra la mayor dosis posible, en función del volumen máximo permisible según la vía de administración empleada (Fariñas y col., 2009). El diseño de los grupos experimentales fue el siguiente descrito en la Tabla No.1.

Sustancia de ensayo.

La obtención del extracto proteoliposómico a partir de la superficie bacteriana de la cepa *Leptospira interrogans* Canicola (Instituto Finlay) se realizó según la metodología descrita por Tamargo y col., 2012. Para la formulación final el extracto fue filtrado con filtros 0.2 µm, el vehículo utilizado fue el tampón TEA (2mM of Tris, 150mM of NaCL, detergente, CaCl₂) y como preservante se empleó tiomersal al 0.005%. Como placebo se utilizó el tampón TEA. Todas las preparaciones fueron almacenadas a 4°C en frascos ámbar. La concentración de proteínas presente en los proteoliposomas fue estimada por el método BCA (Faisal y col., 2003).

Preparación de las dosis de la sustancia de ensayo y sus componentes.

Los bulbos fueron atemperados antes de la inoculación previa reconstitución con las ampollas de diluyente de 5 mL usando jeringuillas desechables de 1 mL y agujas hipodérmicas para la inoculación.

Observaciones clínicas y mortalidad.

Todas las observaciones se comenzaron a realizar a partir de la fecha de inicio experimental tiempo cero (T0) dos veces al día.

Síntomas Clínicos.

Se realizó la exploración clínica de los animales diariamente, prestando especial atención a la aparición y/o manifestación de síntomas como: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación o depresión, incoordinación y diarreas.

Peso corporal.

Se realizaron pesajes a todos los animales a intervalos semanales registrándose de forma individual por grupo y tratamiento. Se realizaron pesajes a los 0, 7 y 14 días (Arencibia y col., 2009; Fariñas y col., 2009).

Consumo de agua.

El agua fue suministrada *ad libitum*, se realizó al comienzo del estudio y luego 2 consumos semanales separados de 24 horas para establecer un promedio de consumo semanal por animal, depositándose 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja, el volumen remanente se registró y calculó por diferencia el volumen consumido por el grupo. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, esta diferencia se dividió entre el número de animales de la caja (Arencibia y col., 2009; Fariñas y col., 2009).

Consumo de alimentos.

Igualmente se realizó al inicio del estudio (T0) y luego 2 consumos semanales separados de 24 horas para establecer un promedio de consumo semanal por animal, depositándose en cada caja 300 g de pienso. Con la ayuda de una balanza técnica se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el consumo de agua (Arencibia y col., 2009; Fariñas y col., 2009).

Estudios anatomopatológicos.

Estos estudios estuvieron programados para realizarse a los 14 días de administrada la única dosis. Los estudios anatomopatológicos programados para la necropsia (evaluación macroscópica) se realizaron inmediatamente de realizada la eutanasia de los animales. Se examinaron macroscópicamente todos los órganos, el sitio de administración de la vacuna y se tomaron muestras de aquellos en los que se observó lesiones macroscópicas. Las muestras de tejidos fueron fijadas durante las primeras 24 h con formaldehído al 10 % neutralizado con carbonato de calcio. Luego fueron procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina. Las observaciones se realizaron con microscopios convencionales Olympus CH-2. Se realizó una descripción detallada de las observaciones recolectadas.

Método de Eutanasia y Punto Final.

Todos los animales se eutanizaron bajo atmósfera de éter, hasta la pérdida total de los reflejos, cumpliendo con las directrices sobre la eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, 2007).

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se creó una base de datos en Microsoft Excel y se procesaron los mismos utilizando el programa estadístico STATISTICA 6.0. Para todos los casos se aplicó como criterio de significación estadística $p < 0.05$. Para las variables continuas (peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento) se realizó un análisis de comparación múltiple, incluyendo la comprobación de la normalidad de los datos, así como el chequeo de la igualdad de varianzas. Los grupos de datos que cumplieron lo antes señalado se procesaron por ANOVA y los que no lo cumplieron por la prueba de Kruskal-Wallis. Para el caso de las variables categóricas se utilizó la prueba no paramétrica de Chi Cuadrado. En todos los casos se comparó contra el grupo control.

Resultados y discusión

La evaluación toxicológica de un nuevo candidato vacunal resulta de vital importancia dentro del ciclo investigativo del mismo. Aunque tradicionalmente las vacunas de células enteras han sido clasificadas con un mayor potencial toxicológico que las vacunas purificadas o de subunidades, las evaluaciones de estas últimas no deben ser nunca descartadas. El candidato proteoliposómico que se evalúa presenta una elevada cantidad de proteínas, factores de virulencia del microorganismo, y lipopolisacárido (LPS). Este último componente es reconocido tradicionalmente por su carácter tóxico pero en el caso de *Leptospira* es importante señalar que el LPS es considerado poco reactogénico; 250 veces menos tóxico que el de *E. coli*. Aún en estas condiciones es necesaria la evaluación mediante las pruebas toxicológicas tradicionales de este nuevo candidato vacunal. Los resultados del ensayo de toxicidad a dosis única del proteoliposoma inoculado vía intramuscular se discuten a continuación.

Durante el ensayo ningún animal experimentó signos y síntomas indicativos de toxicidad. Además no hubo muerte de animales en ningún grupo experimental; ni durante las primeras 24 horas de la administración del producto, ni en los 14 días de observación posteriores a ella. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de toxicidad a dosis única de la vacuna vax-Spiral[®], vacuna de células completas inactivadas y adsorbida en hidróxido de aluminio, donde tampoco fueron observados animales (ratones de ambos sexos) con síntomas clínicos indicativos de toxicidad (Infante y col., 2001), por lo que cabe destacar que este resultado era de esperar ya que por lo general las vacunas de células enteras son mucho más reactogénicas, que las de tipo proteoliposoma obtenidas de proteínas de membrana externa (Silva y col., 2007; Deanna y col., 2011).

En la figura número 1 y 2 se observan los resultados del peso corporal en hámsteres machos y hembras luego de la aplicación de una dosis alta del nuevo candidato vacunal. Al finalizar el estudio los pesos en machos se mantuvieron entre 70 y 80g y para el caso de las hembras el peso estuvo entre 65 y 75g. No se detectaron diferencias significativas entre controles y tratados durante los 14 días que duró el ensayo en ambos sexos. Los resultados de la curva de aumento de peso para esta especie y sexo concuerdan con los obtenidos por Gattermann y col. (2005). Teniendo en cuenta que el incremento del peso corporal es una de las variables que mejor revela el estado de salud general del animal, este resultado corrobora que la inoculación por vía intramuscular de una dosis alta del candidato vacunal en estudio no resultó ser tóxico en las condiciones ensayadas.

Para el caso de los resultados del consumo de agua (Figura 3 y 4), también se mantuvo con valores similares entre controles y tratados para ambos sexos. Los resultados del consumo de agua promedio por animal durante las dos semanas de duración de este estudio no difirieron entre los animales controles y vacunados. Los machos consumieron como promedio entre 13 y 19 mL de agua al final del estudio y las hembras entre 12 y 17 mL. Los resultados del consumo promedio de agua concuerdan con los reportados para esta especie y sexo (Shayne, 2007).

El comportamiento del consumo de alimento constituye otra evidencia de la baja toxicidad de la sustancia evaluada. Normalmente, durante los primeros días, la presencia de sustancias tóxicas provoca una disminución en el consumo de alimentos en los animales. Luego, este consumo tiende a aumentar para compensar la pérdida inicial y evitar el desgaste tisular (Infante y col., 2001). Como se observa en las figuras 5 y 6, no difirieron los resultados del consumo de alimento entre controles y vacunados para ambos sexos durante el ensayo y al final del mismo. Los machos consumieron al final del ensayo entre 8 y 12 g en tanto las hembras consumieron entre 6 y 9 g. Es lógico que los machos consuman mucho más alimento que las hembras ya el mismo está directamente correlacionado con el peso corporal y los machos durante el ensayo y al punto final del experimento presentaron pesos mayores y mayor ganancia neta de peso que las hembras (Shayne, 2007). El consumo de alimento promedio por animal se encuentra dentro de los rangos reportados para este especie y coinciden con los reportados por Gattermann y col., 2005, en un estudio comparativo entre hámster Sirios criados en condiciones de laboratorio y salvajes teniendo en cuenta el peso corporal, las dimensiones corporales, el consumo de alimento y el peso de órganos (Gattermann y col., 2005). La ausencia de interacciones entre los tratamientos y el sexo, sugiere una baja toxicidad del producto probado y similitud entre los mecanismos de desintoxicación del organismo de estos productos en los machos y las hembras (Infante y col., 2001; Arencibia y col., 2009).

Por lo que se concluye que el candidato vacunal evaluado no resultó potencialmente tóxico al ser administrado en dosis única por vía intramuscular en el biomodelo hámster Sirio.

Tabla 1. Diseño experimental en el estudio de dosis única.

Grupo	Sexo	N	N eutanasia
Control	Hembras	10	10
	Machos	10	10
Placebo	Hembras	10	10
	Machos	10	10
Vacuna	Hembras	10	10
	Machos	10	10

Figura 1. Peso Corporal de hámster machos en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. P0= Peso inicial, P7d= Peso a los 7 días de inoculados, P14d= Peso a los 14 días de inoculados.

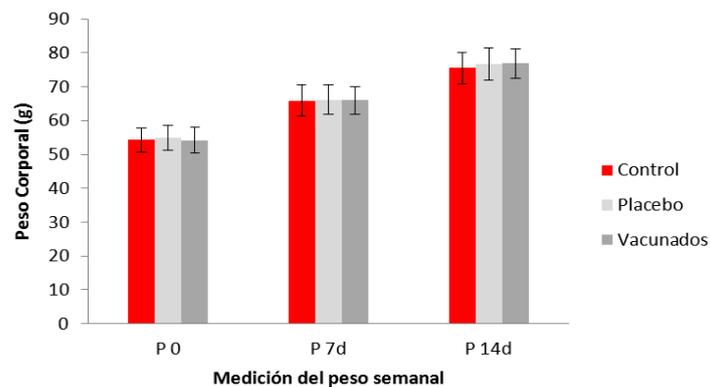


Figura 2. Peso Corporal de hámster hembras en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. P0= Peso inicial, P7d= Peso a los 7 días de inoculados, P14d= Peso a los 14 días de inoculados.

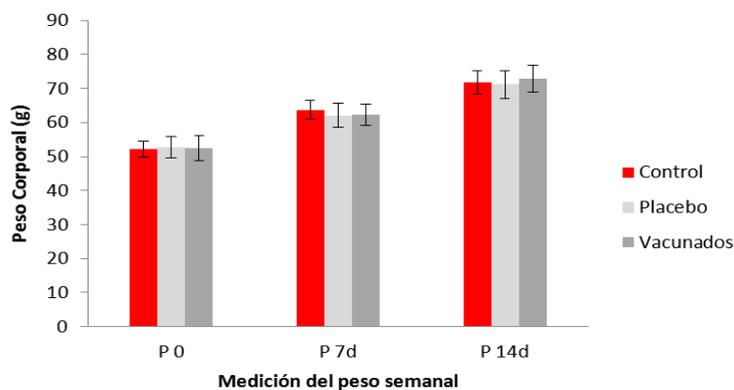


Figura 3. Consumo de agua de hámster machos en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. Cons 1= Consumo al inicio del experimento, Cons 2= Consumo a los 7 días de inoculados, Cons 3= Consumo a los 14 días de inoculados o antes de la eutanasia.

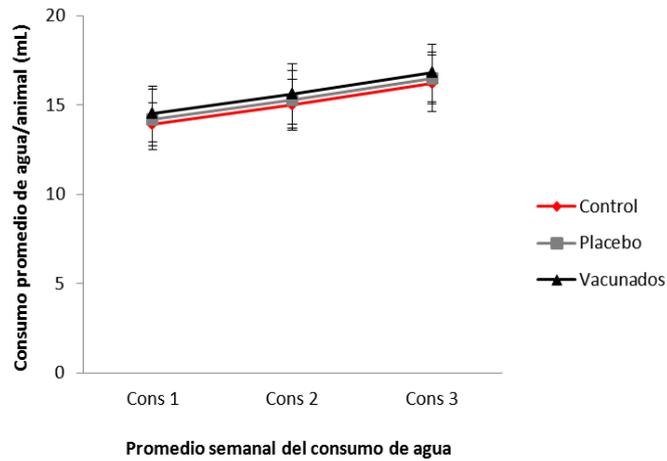


Figura 4. Consumo de agua de hámster hembras en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. Cons 1= Consumo al inicio del experimento, Cons 2= Consumo a los 7 días de inoculados, Cons 3= Consumo a los 14 días de inoculados o antes de la eutanasia.

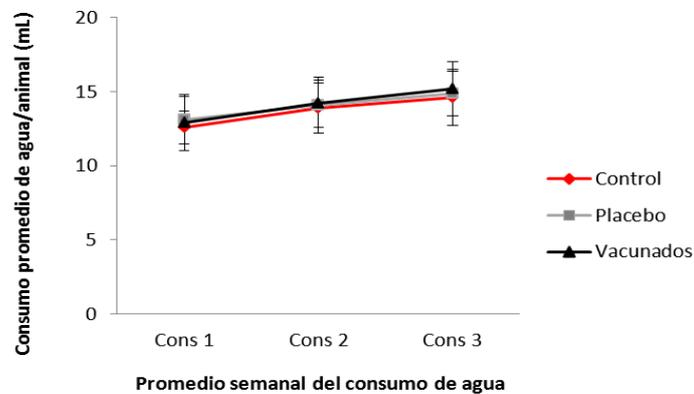


Figura 5. Consumo de alimento de hámster machos en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. Cons 1= Consumo al inicio del experimento, Cons 2= Consumo a los 7 días de inoculados, Cons 3= Consumo a los 14 días de inoculados o antes de la eutanasia.

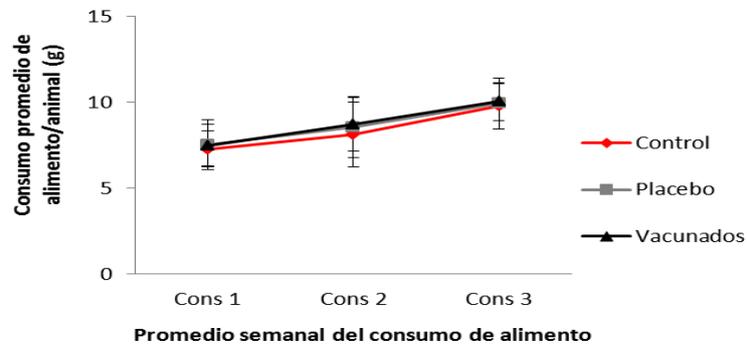
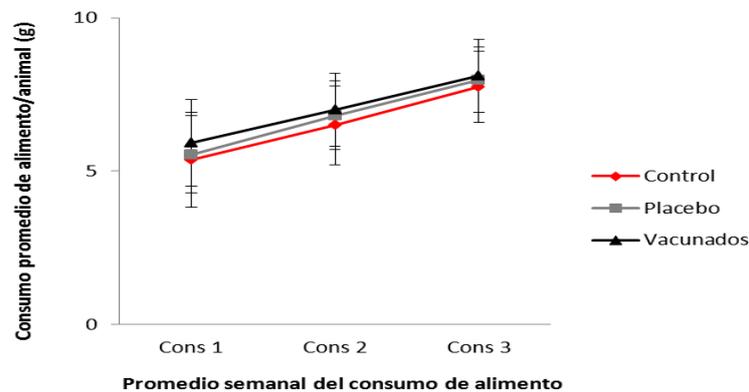


Figura 6. Consumo de alimento de hámster hembras en el estudio de toxicidad por dosis única. Comparación contra en grupo control, $p \leq 0.05$. Cons 1= Consumo al inicio del experimento, Cons 2= Consumo a los 7 días de inoculados, Cons 3= Consumo a los 14 días de inoculados o antes de la eutanasia.



Referencias

1. OPS. Organización Panamericana de la Salud. 14^a Reunión Interamericana a nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Las enfermedades desatendidas en las poblaciones postergadas, con énfasis en las zoonosis. 2005; Disponible en: URL: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rimsa14-18-s.pdf>. Consultado Enero, 2009.
2. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades desatendidas: Enfermedades de la pobreza. 2009; Disponible en: URL: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.htm>. Consultado Enero, 2009.
3. Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2009; 2:4382-4392.
4. McBride A, Athanazio D, Reis M, Ko A. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:376-386.
5. Levett P, Morey R, Galloway R, Steigerwalt A. *Leptospira broomii* sp. nov, isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56:671-673.
6. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28(3):291-318.
7. Rosario LA, Suarez YE, Valdés Y, Batista N. Efectividad de una formulación vacunal de vesícula de membrana externa contra leptospirosis en el biomodelo *Mesocricetus auratus*. I Simposio Internacional SCCAL. Capítulo 4 " Modelos animales utilizados en las investigaciones biomédicas y biotecnológicas". 2011; p. 72-73. ISBN: 978-959-7190-11-0.
8. Tamargo B, Rosario LA, Batista N, Arencibia DF, Fernández K, Villegas A, Ayala JA, Sierra VG. Protección inducida por nanococleatos derivados de proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *VacciMonitor* 2012; 21(1):3-9.
9. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Fariñas M, Infante JF, Díaz D, Prieto JL. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Retel* 2009; 22(1):1-15.
10. Fariñas M, Arencibia DF, López Y, Díaz D, Sifontes S, Infante JF. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay. *Retel* 2009; 24(4):40-54.
11. AVMA. American Veterinary Medical Association. Guidelines on Euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia. USA; 2007.p.1-39.
12. Infante JF, Sifontes S, Muñoz E, González M, Pérez V, Baldor C, Fariñas M. Prueba toxicológica en ratones de una sola dosis inicial segura de la vacuna cubana antileptospirósica vax-SPIRAL. *Biotecnología Aplicada* 2001; 18:20-23.

13. Deanna S, Deveson L, Cullen PA, Miranda L, Srikram A, Rasana W. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine* 2011; 29(18):3413-3418.
14. Silva E, Medieros MA, Mc Bride AJ, Matasunga J, Esteves GS, Ramos JG. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein Lig A confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 2007; 25(33):6277-6286.
15. Gattermann P, Fritzsche R, Weinandy W, Neumann K. Comparative studies of body mass, body measurements and organ weights of wild-derived and laboratory golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory Animals* 2002; 36:445-454.
16. Shayne CG. Animal Models in toxicology. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. *Toxicology: Chapter 4. The Hamster*, 2nd edition, (LLC eds), New York, USA, 2007, pp: 277-312.
17. Faisal SM, Khan MA, Nasti TH, Ahmad N, Mohammad O. Antigen entrapped in the escheriosomes leads to the generation of CD4(+) helper and CD8(+) cytotoxic T cell response. *Vaccine* 2003; 21(19):2383-2393.

Enviado: 15/04/12

Aceptado: 22/04/12