

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación de la Tolerancia Local de la Vacuna Antimeningocócica ACW135 en Ratas Sprague Dawley

Mildrey Fariñas Medina, Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Juan Francisco Infante Bourzac, Yolanda Valdés Abreu, Tamara Hernández Salazar; Reynaldo Oliva Hernández*.

Institución: Instituto Finlay.

Dirección de Preclínica

Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo, Instituto Finlay. Avenida 17 e/198 y 200, Reparto Siboney, Municipio Playa, Habana. Cuba. Apartado Postal 16017.

*E-mail: roh@finlay.edu.cu; reyolivacuba@gmail.com

Resumen

La vacuna combinada de polisacáridos purificados de meningococo de los serogrupos A, C y W₁₃₅, es de nueva obtención y producción entre el Instituto Finlay, Cuba y el Instituto de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil. Por lo que para estudiar el potencial toxicológico de esta vacuna contra meningococos de estos serogrupos, se realizó un estudio de dosis única y tolerancia local, por vía intramuscular en ratas Sprague Dawley. Se administró un volumen de 0,2 mL de las sustancias de ensayo. Una vez tratados, los animales fueron observados diariamente en busca de síntomas locales y sistémicos de toxicidad durante 28 días. Se realizaron, además, mediciones del consumo de agua y alimento, así como del peso corporal. Los animales fueron eutanasiados cumpliendo con las exigencias éticas establecidas y sometidos a necropsia periódicamente realizando estudios anatomopatológicos para observar posibles efectos adversos tras la inmunización con la vacuna en ensayo. No se observaron síntomas de toxicidad ni muertes durante el estudio en los animales. No se encontraron diferencias de interés toxicológico entre los grupos experimentales en cuanto al peso corporal, el consumo de agua y de alimentos. En el estudio anatomopatológico no se observaron lesiones de valor diagnóstico. Estos resultados permitieron concluir que el candidato vacunal en estudio no evidenció producir ni síntomas clínicos, muertes, ni efectos adversos locales al ser aplicado intramuscularmente en modelo animal.

Palabras Claves: Tolerancia Local, Vacuna Antimeningocócica ACW₁₃₅, ratas Sprague Dawley

Abstract

The combined vaccine of purified polysaccharides of the A, C and W135 meningococcal serogroups, are of new obtaining and production among Finlay Institute, Cuba and Bio-Manguinhos/FIOCRUZ Institute, Brazil. To study the toxicological potential of this vaccine against meningococcal of these serogrupos, we were carried out a study of single dose toxicity via intramuscular in Sprague Dawley rats. Was administered 0,2 mL volume of the vaccine. Once treaties, the animals were observed daily in search of local and systemic symptoms of toxicity during 14 days. They were carried out, mensurations of water and food consumption, and the corporal weight. We performed the euthanasia to the animals fulfilling the established and subjected ethical demands to autopsy carrying out anatomopathologic studies to observe possible adverse effects after the immunization with the vaccine. Were not observed toxicity symptoms neither deaths during the study in the animals. There were not differences of toxicological interest among the experimental groups as for the corporal weight and the water and foods consumption. In the anatomopathological study lesions of value diagnosis were not observed. These results allowed to conclude that the vacunal candidate doesn't evidence to take place neither clinical symptoms, deaths, neither local adverse effects, when being intramuscularly applied the used animal model.

Keywords: Local Tolerance, ACW₁₃₅ Antimeningococcal Vaccine, Sprague Dawley rats.

Introducción

La enfermedad meningocócica es una de las principales causas de meningitis bacteriana y septicemia en los países industrializados y en desarrollo, tiene una alta prevalencia a nivel mundial y existen numerosos lugares donde la enfermedad es endémica. Pudiéndose mencionar el cinturón de la meningitis en África, en Asia y algunos países de América también provoca afectaciones, sobre todo en las estaciones del año, secas y frías (1). La organización mundial de la salud prevé el riesgo de ocurrencia de una epidemia a gran escala en varios países (2,3).

El agente causal es una bacteria Gram-negativa: *Neisseria meningitidis*, capaz de colonizar asintóticamente el tracto respiratorio superior. Existen distintos tipos de meningococo, pero cinco serogrupos son los responsables de la mayoría de las infecciones: meningococo A, C, Y, W₁₃₅, y B. La incidencia de la distribución geográfica tanto de la enfermedad como de los serogrupos de la bacteria que la producen, cambian continuamente. Durante los últimos años se ha observado en diferentes regiones un aumento en la circulación del serotipo W₁₃₅. (4,5)

Por lo que teniendo en cuenta estos aspectos antes mencionados y a petición de la Organización Mundial de la Salud ante la realidad de las epidemias en el cinturón de la meningitis en África, el Instituto Finlay de Cuba en colaboración con el Instituto Bio-Manguinhos de Brasil, elaboró una vacuna liofilizada contra los serogrupos A, C, y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis*, que pudiera ayudar a revertir esta situación a nivel mundial; haciéndose necesario como paso previo a su uso seguro en humanos realizar los correspondientes estudios preclínicos toxicológicos de este candidato vacunal.

Para evaluar el potencial tóxico de este producto se realizó un estudio de tolerancia local. El diseño experimental contempló la inoculación intramuscular en ratas Sprague Dawley con 0,2 mL de la formulación vacunal y su placebo, incluyéndose en el ensayo los controles correspondientes. Los animales fueron observados durante 28 días realizando eutanasias periódicas para monitorear las posibles alteraciones en el punto de inoculación y cualquier otra lesión mediante los estudios anatomopatológicos. Este diseño se basó, fundamentalmente, en la información recopilada de la Resolución No. 152/92 MINSAP(6), las Pautas de la OECD para la Evaluación de Fármacos (7), los Estándares de Medicamentos de la Comunidad Europea (8,9) y las normas de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (10), también fueron consultados otros documentos no citados.

Materiales y métodos

Modelo Animal.

Fueron utilizadas ratas Sprague Dawley (SD) de ambos sexos con una edad de 35-37 días y un peso vivo de 101 – 125 g (Edad y peso de recepción) . Los mismos fueron suministrados por el CENPALAB, acompañados de sus certificados de calidad sanitaria. La rata es considerada la especie roedora de preferencia para este tipo de estudio y la línea SD está bien caracterizada y ha sido ampliamente usada por su gran sensibilidad en los estudios de toxicidad (11-13). Es, además, una línea no isogénica, por lo que puede dar una respuesta heterogénea, de mayor relevancia para la especie humana. Se considera que la rata SD constituye un modelo de relevancia potencial para la evaluación de la toxicidad intrínseca y asociada a la respuesta inmune de productos vacunales contra meningococos (14), además se ha usado en otros estudios toxicológicos de vacunas contra meningococos (15, 16).

Condiciones de alojamiento, adaptación y Aleatorización.

Los animales fueron alojados en cajas tipo T4 (área de piso: 1800 cm²) 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 min. a 121 °C cambiándose dos veces por semana. La alimentación consistió en pienso especializado para ratas, suministrado y certificado por el CENPALAB y agua potable como bebida, ambos *ad libitum*. Los locales donde se mantuvieron los animales mantuvieron una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60 ± 5%. Estos parámetros fueron diariamente registrados manteniendo un ciclo de 10 h luz y 14 h oscuridad. Los animales utilizados en este estudio se mantuvieron en adaptación antes del comienzo del experimento durante 7 a 10 días.

De tres a cuatro días después de la adaptación los animales fueron identificados y distribuidos aleatoriamente (Técnica de doble ciega) en función de los grupos experimentales. Concluido el tiempo de adaptación se seleccionaron los animales necesarios de cada sexo para conformar los grupos experimentales. En dicha selección se tuvo en cuenta que los animales estuviesen clínicamente sanos, que los pesos fueran homogéneos y que fueran estadísticamente similares (análisis de varianza de clasificación doble – tratamiento x sexo - y Kruskal Wallis –tratamientos por sexos separados). Los tratamientos fueron asignados a los animales seleccionados de forma aleatoria.

Procedimiento Experimental.

Grupos de tratamiento y vía de administración.

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 Tolerancia Local.

La dosis de vacuna propuesta para uso clínico en humanos es de 0,5 mL. El máximo permisible para ratas de estas tallas y pesos es un volumen de 0,2 mL (17; 18). 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.

El estudio de tolerancia local tuvo una duración de 28 días; su finalidad es evaluar los efectos adversos locales potenciales asociados a la administración del producto. Se aplicó el número de dosis recomendadas en el esquema de inmunización propuesto para humanos (una dosis). Luego de la única dosis se realizaron eutanasias a diferentes tiempos y se estudiaron histológicamente los tejidos expuestos directamente al producto.

El diseño de los grupos experimentales fue el siguiente descrito en la Tabla No.1

Composición de la vacuna.

Sustancias Activas.

Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo A	50 µg
Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo C	50 µg
Polisacárido purificado de <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo W ₁₃₅	50 µg

Placebo.

Diluyente para vacuna polisacarídica, acompañados con el correspondiente certificado de análisis de calidad emitidos por AICA (Laboratorio Farmacéutico) de liberación de lote. El mismo fue almacenado a una temperatura de 2-8 °C hasta su uso.

<u>Ingredientes</u>	<u>Concentración</u>
Lactosa	2,5 – 5,0 mg
Cloruro de Sódio	4,159 50 µg
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro Na ₂ HPO ₄	0,053_50 µg
Fosfato de Sódio monobásico NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,0205 µg
Agua para inyección q.s.p	0,500 mL

Proveedor: Dirección de Producción. Instituto Finlay, Habana. Cuba.

Condiciones de almacenamiento: Ídem a la sustancia de ensayo.

Observaciones Clínicas.

Todas las observaciones se comenzaron a realizar a partir de la fecha de inicio experimental tiempo cero (T0) dos veces al día, considerado este como el momento en que se comenzaron a tomar los primeros datos específicos del estudio.

Síntomas Clínicos.

Se realizó la exploración clínica de los animales diariamente, prestando especial atención al punto de inoculación y a la aparición y/o manifestación de síntomas como: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación o depresión, incoordinación y diarreas; así como otros síntomas que pudieran aparecer asociados al producto.

Peso corporal.

Los animales fueron pesados al comienzo y fin del período de adaptación registrando los pesos en aras de seleccionar aquellos que participarían en el estudio. En el momento de la inoculación se pesaron los animales para saber peso real de los mismos al comienzo del estudio; para las hembras estuvo en el rango de 145 – 189 g y para los machos de 181 – 227 g. Así mismo, se realizaron pesajes a todos los animales a intervalos semanales registrándose de forma individual por grupo y tratamiento, Se realizaron pesajes a los 0, 3, 7, 14, y 28 días después de realizada la inoculación.

Consumo de agua.

El agua fue suministrada *ad libitum*, se realizó al comienzo del estudio (T0) y luego en días alternos se midió el remanente de agua con una probeta de 1000 mL; para ello, se depositaron 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja de ratas, 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 y el número de días transcurridos desde la última medición.

Consumo de alimentos.

Igualmente se realizó al inicio del estudio (T0) y luego en días alternos, cada vez que se hizo una medición se completaron en las tolvas de las cajas 500 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.

Estudios anatomopatológicos.

Estos estudios estuvieron programados para realizarse a los 3, 7, 14 y 28 días de la única dosis aplicada. Las evaluaciones macroscópicas se realizaron inmediatamente de realizada la eutanasia de los animales donde se examinaron todos los órganos y solo se tomaría muestra de aquellos donde existiera una lesión y si fueron tomadas muestras del sitio de inoculación de todos los animales, tales como piel y tejido celular subcutáneo, músculo de la región, ganglio linfático poplíteo e inguinal profundo. Las muestras de tejidos fueron fijadas durante las primeras 24 h con formaldehído al 10 % neutralizado con carbonato de calcio y posteriormente procesadas por técnicas de rutina de histopatología.

Método de Eutanasia y Punto Final.

El método de eutanasia de los animales se realizó por sobre dosis de anestésicos general Alothane BP por sobre dosis de exposición por inhalación, recomendados por consejo canadiense para el cuidado de los animales de laboratorio, descrito en la guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (19), cumpliendo con las directrices sobre la eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (20), y aprobado por el comité de ética del Instituto Finlay. Este método se aplicó en momento del punto final del estudio y grupos de animales según diseño experimental.

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 (21). Para todos los casos se aplicó como criterio de significación estadística $p < 0.05$, excepto para la verificación de la aleatorización que se consideró significativo un valor de $p < 0,1$. 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 varianza. 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.

Resultados y discusión.

Signos clínicos y mortalidad.

Durante el ensayo no se observaron síntomas clínicos, ni se registraron muertes en ninguno de los animales en estudio.

Peso corporal.

Todos los animales incrementaron su peso corporal durante el estudio y en cada una de las evaluaciones puntuales realizadas a los 3, 7, 14 y 28 días post-inoculación (Gráficos No.1-4); no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control ($P < 0.05$) y los machos mostraron un aumento de peso más acelerado que las hembras ($P < 0.05$). Las curvas de incremento de peso de los animales se correspondió con las observadas en ensayos anteriores en nuestras instalaciones y los reportados por la literatura. (22-26)

Consumo de agua.

El comportamiento de este parámetro se comportó de forma similar entre todos los grupos evaluados en el estudio de tolerancia local no evidenciándose diferencias estadísticas entre los grupos tratados y el control en ninguno de los tiempos evaluados durante el estudio ($P < 0.05$, Gráficos No. 5- 12), siendo para las hembras de 20,72 – 27,68 mL y los machos de 25,46 – 30,63 mL. En general, estos resultados se correspondieron con los valores históricos observados para las ratas de esta categoría en nuestras instalaciones (22-24)

Consumo de alimentos.

El consumo de alimentos, no mostró diferencias estadísticas entre los grupos tratados y el control en ninguno de los tiempos evaluados durante el estudio ($P < 0.05$, Gráficos No.13-20); los machos consumieron más que las hembras ($P < 0.05$), de 22,60 – 27,51g los machos y de 17,52 – 20,37g las hembras, todo lo cual coincidió con las medias históricas de los animales de esta línea y categoría.(22-24)

Estudio anatomopatológico.

Durante las necropsias realizadas, no se observaron lesiones macroscópicas de valor en órganos ni en el punto de inoculación, tampoco se apreciaron alteraciones de valor toxicológico desde el punto vista microscópico en el punto de inoculación, piel, tejido

celular subcutáneo, ni en los ganglios linfáticos poplíteo e inguinal profundo. No obstante describimos y discutimos a continuación las lesiones observados durante el estudio desde un punto de vista macro y microscópico.

En la evaluación anatomopatológica macroscópica realizada se estableció en los animales macho 38, 19 y 24 pertenecientes al grupo vacunados de la primera eutanasia, procesos de hemorragias puntiformes a nivel del sitio de inoculación, estos procesos son frecuentemente observados en animales que reciben productos aplicados mediante agujas hipodérmicas debido al traumatismo ocasionado por objetos punzantes al lesionar los vasos sanguíneos del tejido donde se practica la inyección y que han sido observado en ensayos similares y en la misma especie (27-28); donde posteriormente en la investigación histopatológica no fueron revelados teniendo en cuenta los planos de clivaje de los cortes y el tamaño puntiforme de la lesión antes descrita.

En los animales hembra 33 placebo y en el macho 23 placebo de la segunda eutanasia, así como en las hembras número 31 placebo y 49 control de la tercera eutanasia se hallaron pequeños quistes del timo, esta lesión carece de valor toxicológico dada su aparición en solo en 4 animales, 3 animales placebos y en 1 control, por lo que no parece tener relación con el producto aplicado, esto quistes generalmente carecen de malignidad y su presentación es escasa (29). Por otra parte en el resto de los animales no se observaron lesiones macroscópicas.

Lo estudios histopatológicos arrojaron leve infiltrado a base de células redondas en el tejido celular subcutáneo de la piel en la rata hembra 24 vacunada de la primera eutanasia, mientras que en el resto de los animales ninguno presentó lesiones ni en piel, tejido celular subcutáneo, ni a nivel del músculo donde se realizó la inoculación del placebo y la vacuna en ensayo, estas lesiones en tejido celular subcutáneo pueden aparecer como respuesta inflamatoria causada por los traumas mencionados en párrafos anteriores y han sido observadas en otros ensayos (30).

En el análisis realizado a los ganglios linfáticos regionales correspondientes al punto de inoculación como se puede observar que en la primera eutanasia (Tabla No.2), los diferentes procesos relacionados con posibles reacciones del sistema inmune en estos órganos secundarios de la inmunidad fueron los siguientes, folículos secundarios en las zonas subcorticales y paracorticales, apoptosis de linfocitos en los centros germinales, así como la presencia de células plasmáticas en el hilio de dichos ganglios linfáticos, todas estas tuvieron poca frecuencia y no aportaron diferencias estadísticas significativas entre los diferente grupos y sexos que conformaron el ensayo.

Como es sabido en los ganglios linfáticos comienza la respuesta de la inmunidad adaptativa al antígeno que haya penetrado a través de la piel o que esté presente en los tejidos. De esta forma los centros germinales de los folículos linfoides se caracterizan por tener un área central de aspecto claro en las coloraciones histológicas habituales. Los

folículos desprovistos de centros germinales se denominan folículos primarios y los que lo tiene se denominan secundarios. Los folículos de los ganglios linfáticos son la zona de los linfocitos B, los folículos primarios contienen fundamentalmente linfocitos B vírgenes maduros, los centros germinales surgen a raíz de la estimulación antigénica representan lugares de notable proliferación para linfocitos B donde ocurre la selección de aquellas células que producen los anticuerpos de alta afinidad y la generación de los linfocitos B de memoria. Los linfocitos T están situados básicamente debajo de los folículos y en una posición mas central ocupando los cordones paracorticales (31).

En el caso de la segunda eutanasia (Tabla No.3) pudo apreciarse la presencia de folículos secundarios subcapsulares y paracorticales, así como apoptosis de linfocitos en los centros germinales y células plasmáticas a nivel del hilio ganglionar aportaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los animales machos vacunados y el resto de los grupos, esto pudiera guardar relación con las estimulación del sistema inmune a partir del antígeno vacunal inoculado, coincidiendo con otros estudios conducidos en esta especie en nuestro laboratorio (27).

En la tercera eutanasia (Tabla No.4) resultaron estadísticamente significativo los Folículos Secundarios, subcapsulares y paracorticales, apoptosis de los linfocitos y células plasmáticas en el hilio de los machos vacunados ($P < 0,05$) al igual que en la segunda eutanasia y pudiera continuar siendo parte de la respuesta inmunológica del modelo animal utilizado ante la estimulación antigénica que constituye la inmunización con la vacuna ACW₁₃₅.

En la cuarta eutanasia (Tabla No.5) no se observaron resultados significativos estadísticamente, aunque debemos mencionar que aun se observaron alteraciones que tal vez tengan relación con la respuesta inmune inducida por el antígeno inoculado como fueron, los folículos secundarios subcapsulares y paracorticales, con linfocitos en apoptosis y células plasmáticas en el hilio de los animales pertenecientes a ambos sexo, lo cual pudiera también responder a la situación aludida en el párrafos anteriores.

Estos resultados confirman las evidencias de otros estudios realizados en vacunas investigadas por el Instituto Finlay que han demostrados la no toxicidad de las mismas como en los estudios de toxicidad de VA-DIFTET® por administración a dosis repetida en ratones (32), la toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley (33).

Conclusiones.

Bajo las condiciones del estudio y según los criterios establecidos, el candidato vacunal no evidenció efectos adversos toxicológicos en el modelo animal usado siendo bien tolerado por estos al ser aplicada la misma por vía intramuscular; no se observaron alteraciones anatomopatológicas de valor toxicológico en los análisis macroscópicos, ni microscópicos a nivel del punto de inoculación, siendo observada respuestas inmunohistológica a nivel de los ganglios linfáticos regionales que pudieran estar relacionados con la respuesta inmune inducida por el producto, por lo que se considera potencialmente no tóxica y bien tolerable para su uso en humanos.

Agradecimientos: Deseamos agradecer al personal de apoyo de la instalación de animales por toda la ayuda y soporte brindado durante el estudio, Alex Quintero Pérez, Pedro Daniel Alfonso Anazco, Agustín Borrero Delgado y a la Lic. Longeva Campos de la vicepresidencia de Calidad del Instituto Finlay por su colaboración.

Tabla No.1: Diseño Experimental Estudio de Tolerancia Local

SEXO	GRUPO	No. Animales	Días /No. de eutanasias			
			3	7	14	28
Hembras	Control	20	5	5	5	5
	Placebo	20	5	5	5	5
	Vacuna	20	5	5	5	5
Machos	Control	20	5	5	5	5
	Placebo	20	5	5	5	5
	Vacuna	20	5	5	5	5

Tabla No.2: Estudio de Tolerancia Local de la vacuna ACW₁₃₅. Alteraciones histopatológicas relacionadas con el sistema inmunológico en ratas SD Hembras y Machos. Primera eutanasia (3 días post-inoculación).

No. Orden	Alteración Observada	V	P	C
Sexo Macho		N		
1	Folículos secundarios paracorticales, con apoptosis de linfocitos	0/5	0/5	2/5
2	Folículos secundarios subcapsulares y células plasmáticas en el hilo	0/5	1/5	1/5
3	Folículos secundarios paracorticales, con apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilo.	1/5	0/5	0/5
4	Folículos secundarios subcapsulares y paracorticales, con linfocitos en apoptosis.	0/5	0/5	1/5
Sexo Hembras		N		
1	Folículos secundarios subcapsulares	0/5	1/5	0/5
2	Folículos secundarios paracorticales y subcapsulares, con apoptosis de linfocitos.			
3	Folículos secundarios subcapsulares, linfocitos en apoptosis y células plasmáticas en el hilo.	0/5	0/5	1/5
4	Discreto infiltrado inflamatorio base de células redondas en el tejido celular subcutáneo del punto de inoculación.	1/5	0/5	0/5

Leyenda:
 V- Vacunados
 P- Placebos
 C- Controles
 N- Número de animales.

Tabla No.3: Estudio de Tolerancia Local de la vacuna ACW₁₃₅. Alteraciones histopatológicas relacionadas con el sistema inmunológico en ratas SD Hembras y Machos. Segunda eutanasia (7 días post-inoculación).

No. Orden	Alteración Observada	V	P	C
Sexo Macho		N		
1	Folículos secundarios, subcapsulares y paracorticales, apoptosis de los linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	4/5	0/5	2/5
2	Folículos secundarios paracorticales y apoptosis de linfocitos.	0/5	1/5	0/5
3	Folículos secundarios subcapsulares y células plasmáticas en el hilio.	0/5	1/5	1/5
Sexo Hembras		N		
1	Folículos secundarios, subcapsulares y paracorticales, apoptosis de los linfocitos y células plasmáticas en el hilio	1/5	0/5	2/5
2	Folículos secundarios paracorticales, apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio..	0/5	1/5	0/5
3	Folículos secundarios subcapsular, apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio..	0/5	1/5	0/5

Leyenda:
 V- Vacunados
 P- Placebos
 C- Controles
 N- Número de animales.

Tabla No.4: Estudio de Tolerancia Local de la vacuna ACW₁₃₅. Alteraciones histopatológicas relacionadas con el sistema inmunológico en ratas SD Hembras y Machos. Tercera eutanasia (14 días post-inoculación).

No. Orden	Alteración Observada	V	P	C
Sexo Macho		N		
1	Folículos secundarios paracorticales con apoptosis de linfocitos	0/5	1/5	0/5
2	Folículos secundarios subcapsulares y apoptosis de linfocitos	0/5	1/5	0/5
3	Folículos secundarios subcapsulares y paracorticales con apoptosis de linfocitos.	0/5	1/5	0/5
4	Folículos secundarios subcapsulares y paracorticales con linfocitos en apoptosis y células plasmáticas en el hilio.	4/5	0/5	0/5
5	Folículos secundarios subcapsulares y apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	0/5	0/5	1/5
Sexo Hembras		N		
1	Folículos secundarios paracorticales.	1/5	0/5	0/5
2	Folículos secundarios paracorticales y subcapsulares con apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	2/5	0/5	2/5
3	Folículos secundarios subcapsulares, linfocitos en apoptosis y células plasmáticas en el hilio.	0/5	0/5	1/5
4	Folículos secundarios paracorticales, con apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	1/5	1/5	1/5

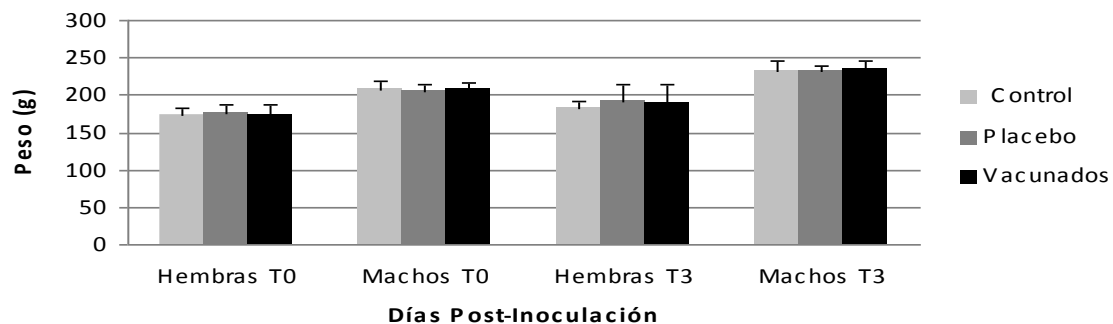
Leyenda:
 V- Vacunados
 P- Placebos
 C- Controles
 N- Número de animales.

Tabla No.5: Estudio de Tolerancia Local de la vacuna ACW₁₃₅. Alteraciones histopatológicas relacionadas con el sistema inmunológico en ratas SD Hembras y Machos. Cuarta eutanasia (28 días post-inoculación).

No. Orden	Alteración Observada	V	P	C
Sexo Macho		N		
1	Folículos secundarios paracorticales y subcapsulares con apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	3/5	4/5	2/5
Sexo Hembras		N		
1	Folículos secundarios paracorticales y subcapsulares con apoptosis de linfocitos y células plasmáticas en el hilio.	1/5	2/5	1/5
2	Folículos secundarios subcapsulares, con linfocitos en apoptosis y células plasmáticas en el hilio	4/5	0/5	2/5

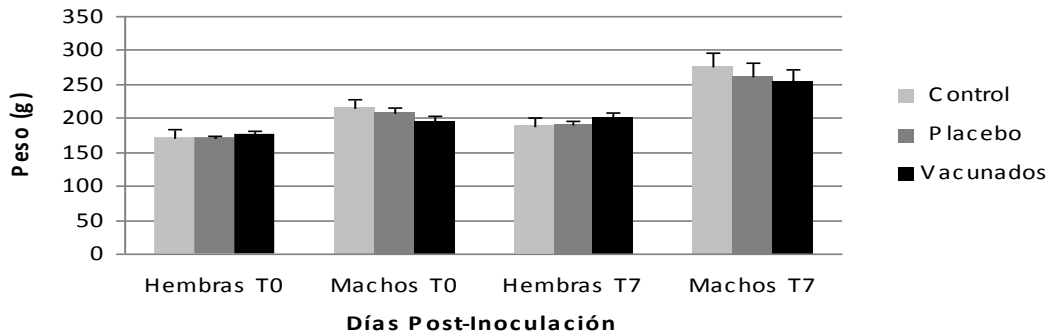
Leyenda:
 V- Vacunados
 P- Placebos
 C- Controles
 N- Número de animales.

Gráfico No.1: Comportamiento del peso corporal en ratas S D Hembras y Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



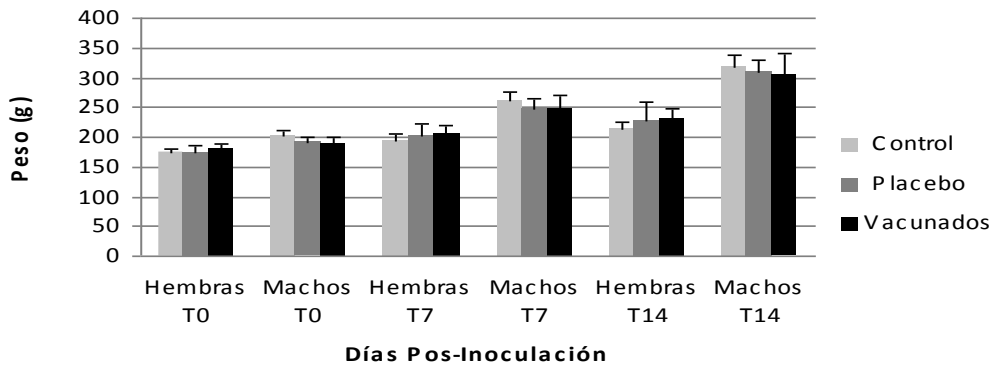
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No.2: Comportamiento del peso corporal en ratas S D Hembras y Machos. Estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



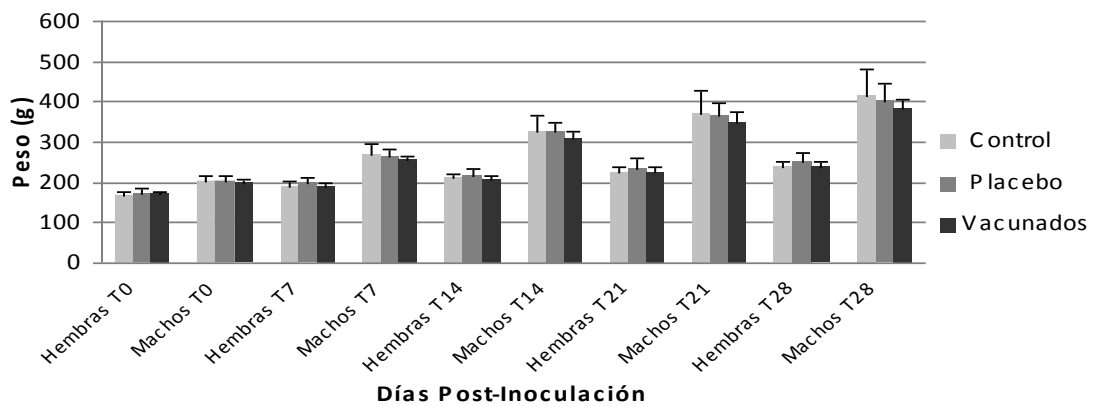
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No.3: Comportamiento del peso corporal en ratas S D Hembras y Machos. Estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



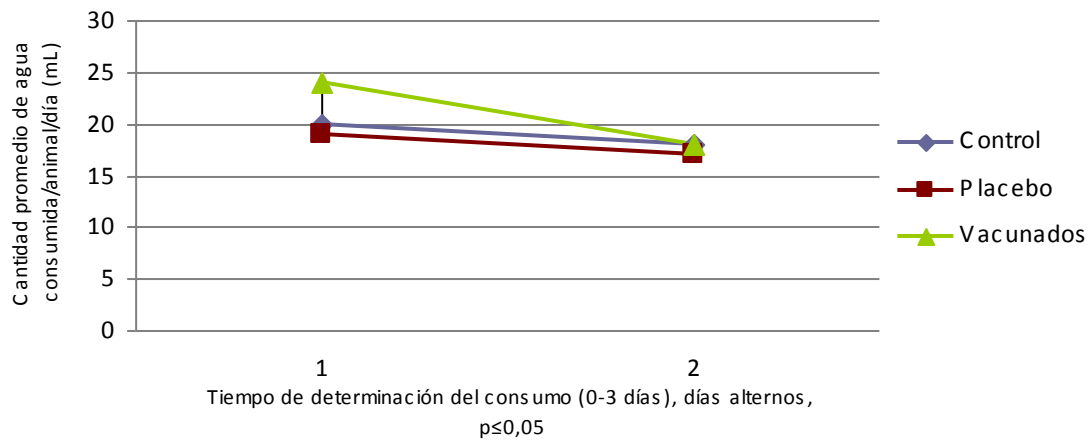
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No.4: Comportamiento del peso corporal en ratas S D Hembras y Machos. Estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



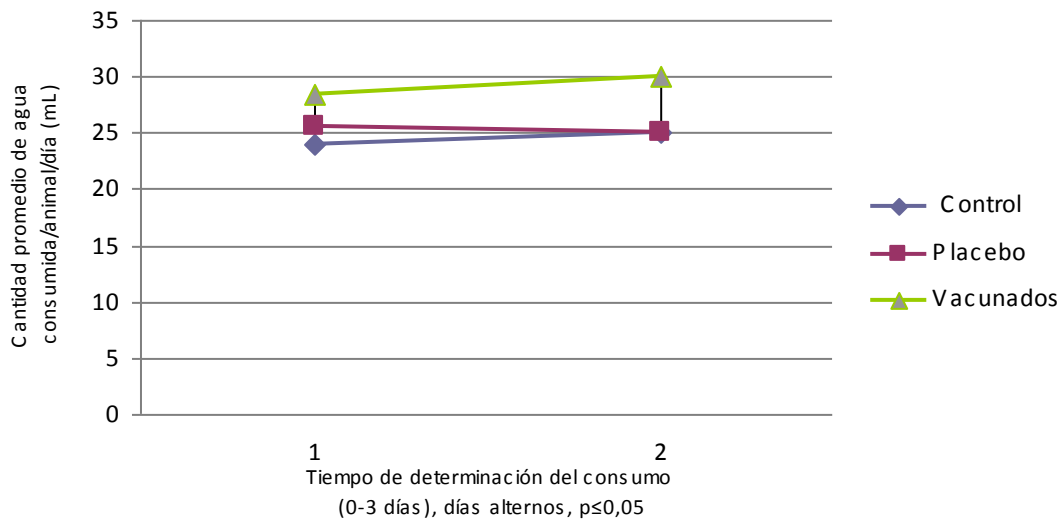
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 5: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



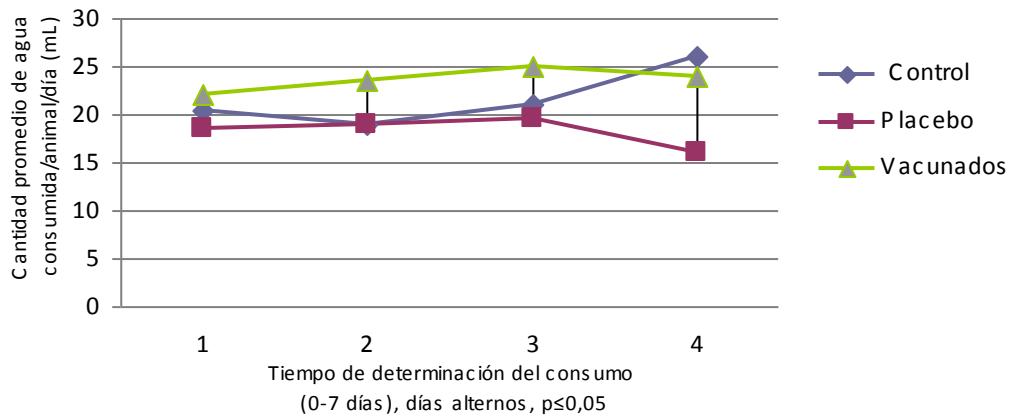
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 6: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



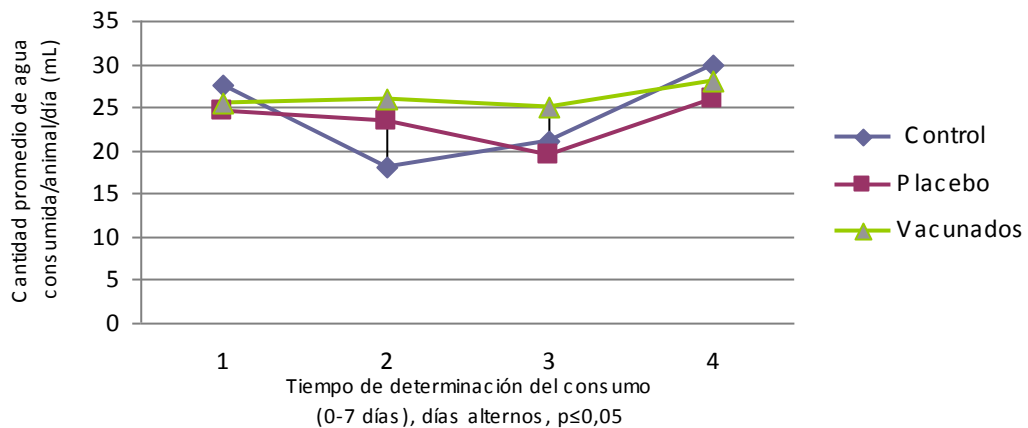
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 7: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



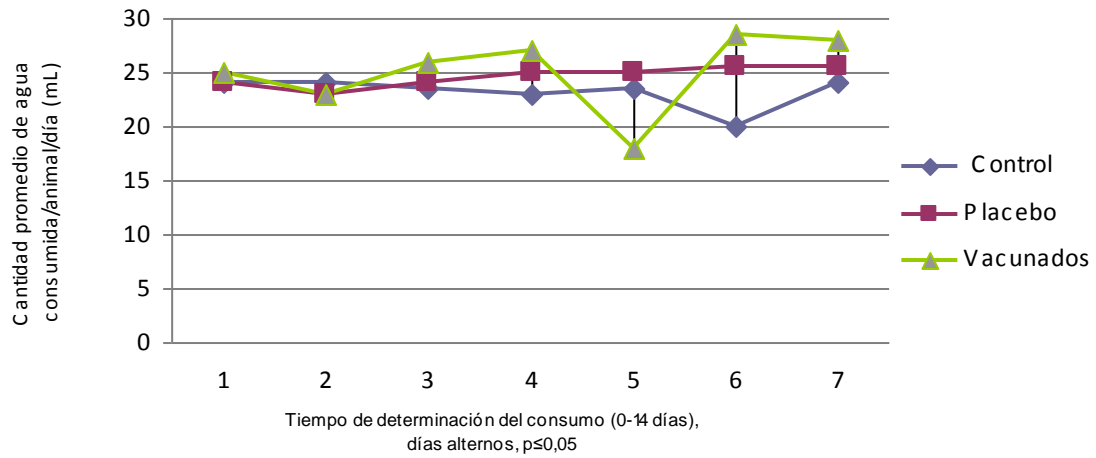
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 8: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



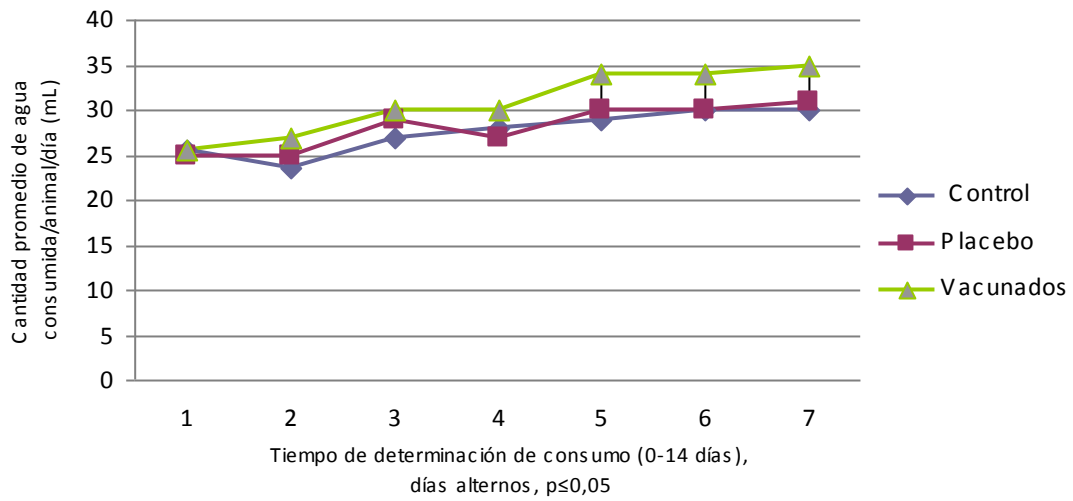
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 9: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



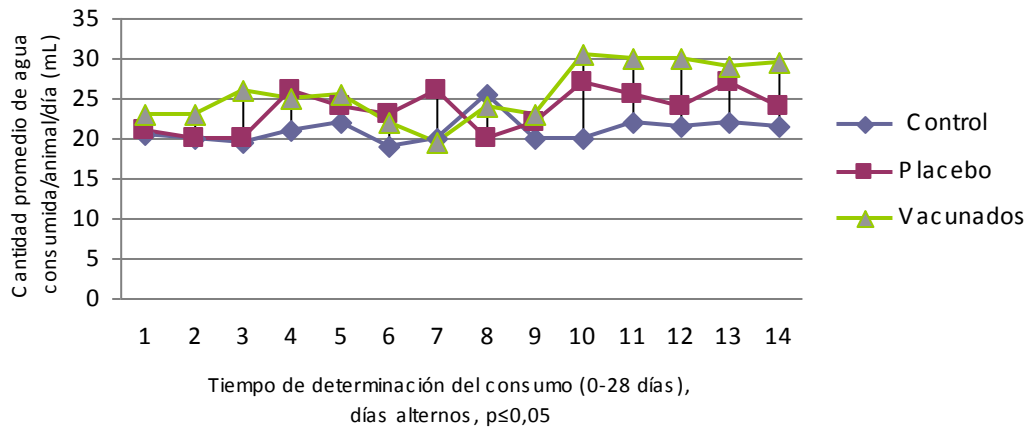
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 10: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



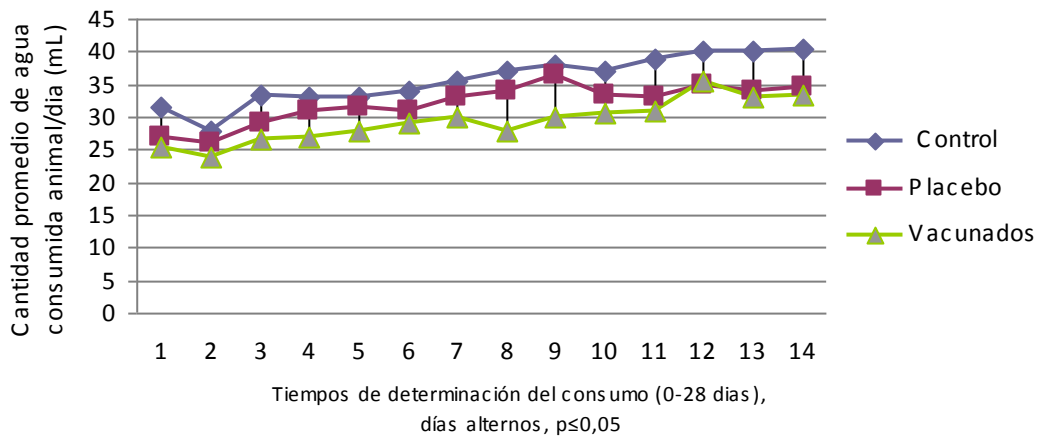
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 11: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135



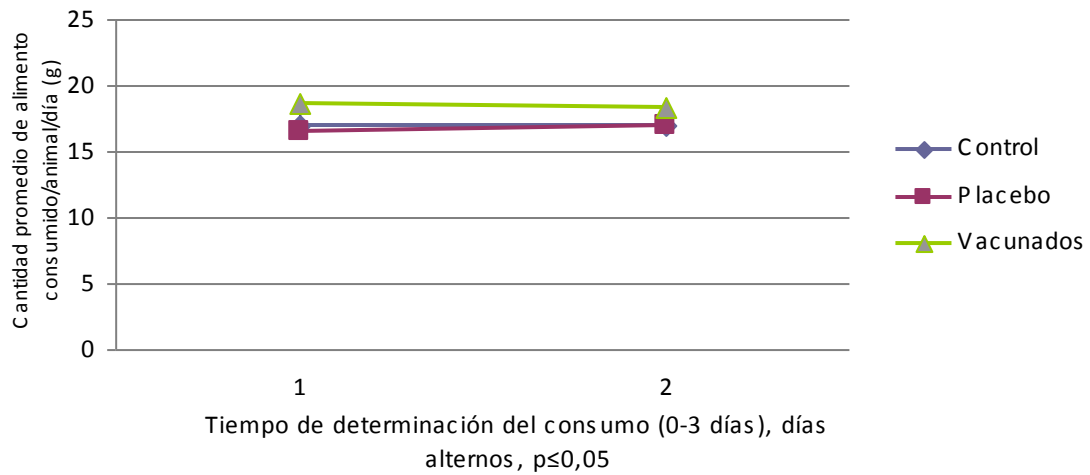
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 12: Comportamiento del consumo de agua en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



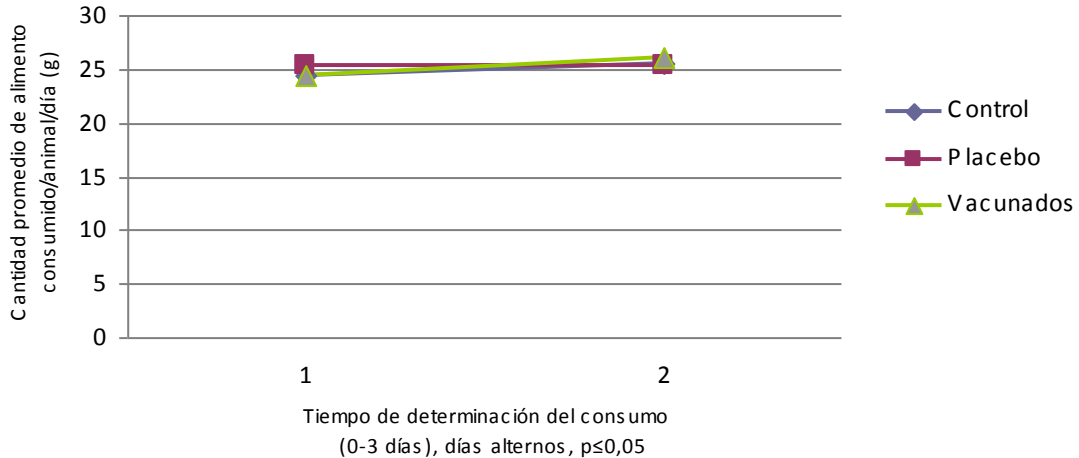
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, ANOVA

Gráfico No. 13: Comportamiento del consumo de alimento en ratas S D Hembras. E studio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



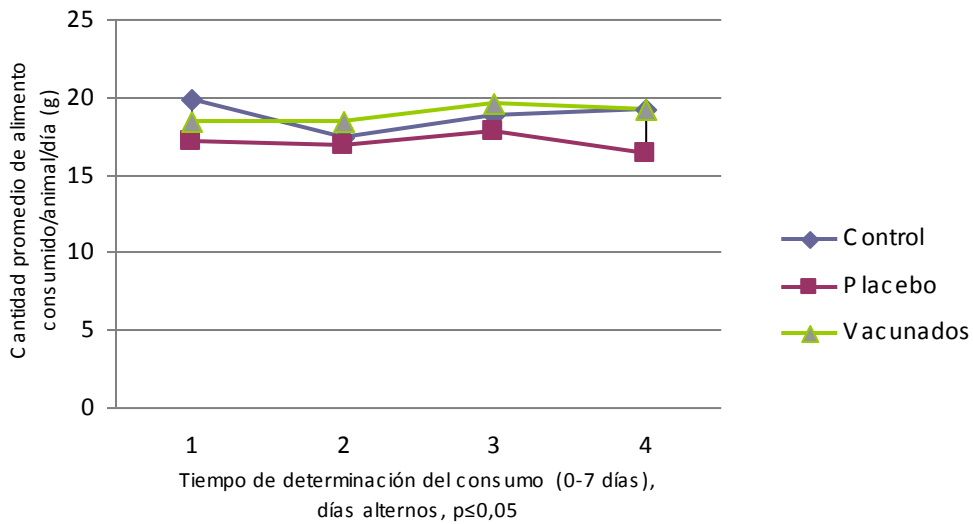
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 14: Comportamiento del consumo de alimento en ratas S D Machos. E studio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



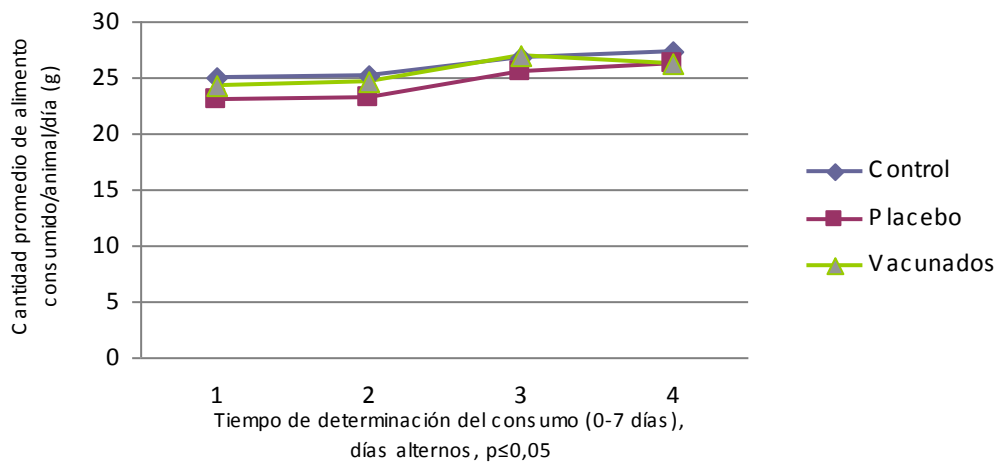
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 15: Comportamiento del consumo de alimento en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



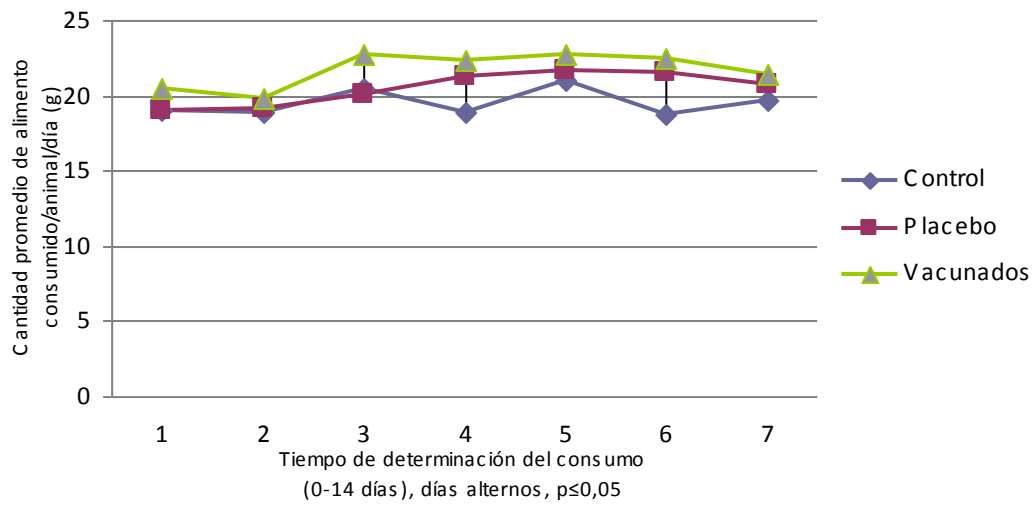
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 16: Comportamiento del consumo de alimento en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



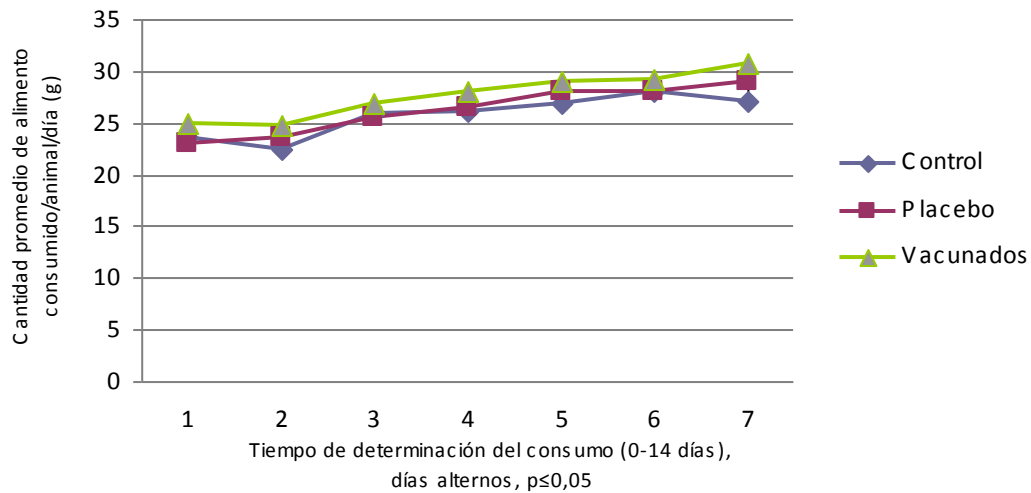
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 17: Comportamiento del consumo de alimento en ratas S D Hembras. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



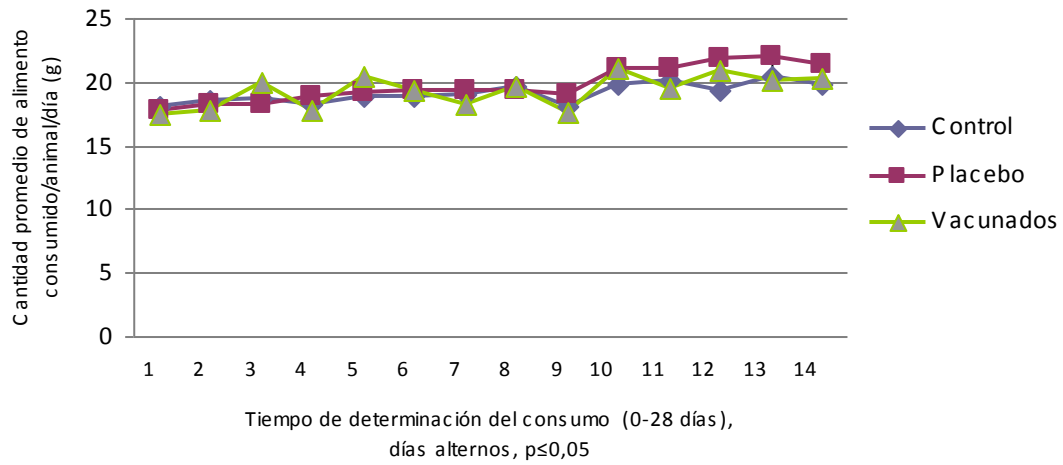
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 18: Comportamiento del consumo de alimentos en ratas S D Machos. E estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



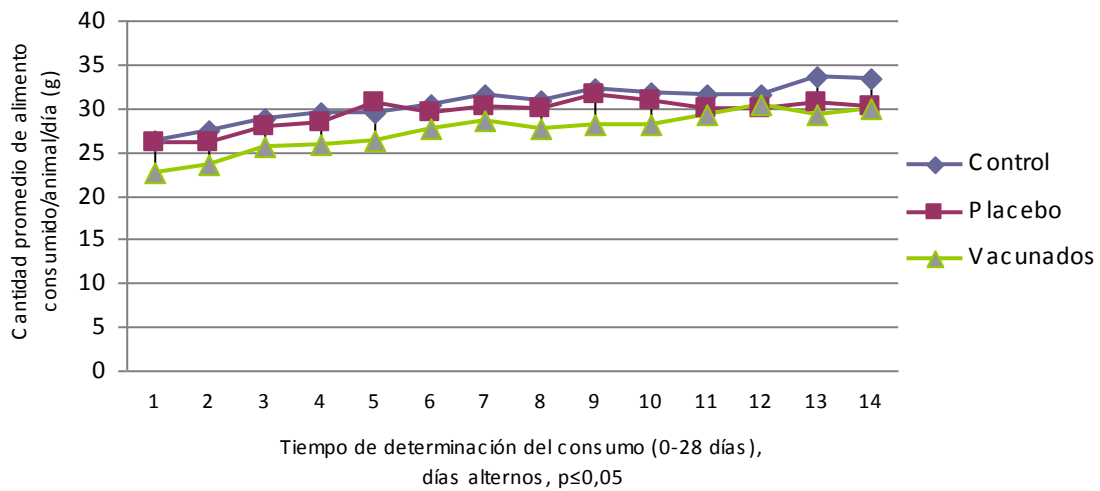
X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 19: Comportamiento del consumo de alimentos en ratas S D Hembras. Estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Gráfico No. 20: Comportamiento del consumo de alimentos en ratas S D Machos. Estudio de Tolerancia Local Vacuna ACW135.



X, media ± D.E, desviación estándar. Comparación entre grupos $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis.

Referencias Bibliográficas

- 1-** Ochoa RF; Sierra G; Martínez I, Cuevas I. Prevención de la Enfermedad Meningocócica. Finlay Ediciones, 2010, ISBN: 978-959-7076-22-3. <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
- 2-** WHO. World Health Organization Epidemiological Centre, Fact sheet N°141, Revised May 2003.
- 3-** WHO. World Health Organization. Control of epidemic meningococcal disease. WHO Practical guidelines. 2ª Ed. Disponible en: <http://www.who.int/emc>. Consultado: Enero 2011.
- 4-** Almeida A. Enfermedad por meningococo, Neisseria meningitidis: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. Salud pública Méx. [serial on the Internet]. 2004 Oct. 46(5): 438-450. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000500010 Consultado: Febrero 2011.
- 5-** WHO. World Health Organization May 2005. Proceedings Immunization of the fifth Global Vaccine research Forum. Montreux, Switzerland 7-10 June 2004. Immunization, Vaccines and Biologicals. http://www.who.int/vaccine_research/documents/GVRF04_Report.pdf . Consultado: Febrero 2011.
- 6-** Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de la Calidad en Ensayos Toxicológicos. Resolución No. 152/92. Editorial Ciencias Médicas. MINSAP 1993.
- 7-** Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Vol 1 and 2. Prot. 407. Paris 1993.
- 8-** Normas sobre Medicamentos de la Comunidad Europea, Vol. III. "Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano". Directrices Fármaco-Toxicológicas. Página 91 (No. 2, secc. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE). Versión español. Enero 1989 y 1998.
- 9-** Regulación 75/318 CEE. Normas y Protocolos Analíticos, Tóxico-Farmacológicos y Clínicos en materia de pruebas de Medicamentos. 1997.
- 10-** Agencia Europea para la Evaluación de Productos de Medicina (EMA). Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines, 1997.
- 11-** Infante JF, Pérez MO, Sifontes RS, Díaz RD, del Campo J, Roble SE. Ensayo de Tolerancia Local de los cocleatos en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/01/04, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.

- 12-** Sosa E, Sifontes S, Infante JF, Díaz D, López Y, Pérez V, Hernández T, Riverón L, Valdés Y, García I, Fariñas M, Parajón E, Rodríguez N. Estudio de tolerancia local de la vacuna vax-TyVi® en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 2005; 14(1):21-27
- 13-** Food and Drugs Administration FDA. Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research February 2006.
- 14-** Verdier F. Non-Clinical Safety Assessment of Preventive Vaccines. The Industry Perspective. Proceedings of the Workshop on: Non-Clinical Safety Evaluation of Preventive Vaccines: Recent Advances and Regulatory Considerations. Vol I. Arlington, Virginia. 2002; 39-72.
- 15-** Sifontes S. Estudio de Toxicidad por dosis Única de la Vacuna Antimeningocócica VA-MENGOC-BC® en ratas Sprague Dawley. Informe Técnico. Instituto Finlay. 2004.
- 16-** Estudio de inocuidad e inmunogenicidad protectogénica de la vacuna antimeningocócica VA- MENGOC- BC en modelos murinos. Tesis de grado científico Juan Francisco Infante Bourzac. Vicepresidencia de Investigaciones Instituto Finlay, Centro autorizado Universidad Agraria de la Habana, año 2000; 1-123.
- 17-** Voisin. Extrapolation of Animal Toxicity to Humans: interspecies comparisons in drug development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1990; 12(2):107-116.
- 18-** Karl D, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumen. *J. Appl. Toxicol* 2001; 21:15-23.
- 19-** Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition, http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12910. PAPERBACK ISBN-10: 0-309-15400-6 ISBN-13: 978-0-309-15400-0. 2010; 27-57.
- 20-** AVMA. American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia, (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia) June, 2007. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.
- 21-** Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. 2003.
- 22-** Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E, Fariñas M, Núñez F, Hernández T, Torres V. Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia

- local de la vacuna vax-SPIRAL® en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2004; 13(2):11-16.
- 23-** Ensayo de Toxicidad por Dosis única de la Vacuna DT-Poli Vi en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/6/2003, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.
- 24-** Ensayo de Tolerancia Local de la Vacuna Antitifoídica vax-TyVi® en ratas Sprague Dawley. Ensayo Preclínico P/3/2003, Dirección de Modelos Experimentales y Toxicología Pre-Clínica, Instituto Finlay, 2003.
- 25-** Johns Hopkins University. (JHM) Animal care and use committee. Address. 620 McElderry Street Reed Hall, Room B122 Baltimore, MD 21205-191. 2010; 78-97. <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>. 2010.
- 26-** Núñez JF, Herrera I, Infante JF, González P, Pérez V, Argamasilla M. Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 2006; 15(2):9-14.
- 27-** Infante JF, Sierra G, Oliva R, *et al.* Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones vacunados VAMENGO BC por vía intramuscular. *Vaccimonitor* Año 6 No 2 pag. 2-6 1997.
- 28-** Infante JF, Medina R, Oliva R; *et al.* Inocuidad inespecífica realizada al B(1-3) glucano. *Revista salud animal* 17(2) 45-54 1995.
- 29-** Góngora JH, Robador JC, De la Cuesta P. Quiste tímico lobulado. Reporte de un caso. IV Congreso Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Taller Patologías del Mediastino. 2001.
- 30-** Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E: , Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL en ratas Sprague Dawley *Vaccimonitor* 2004 ; 13 (2):11-16.
- 31-** Inmunología celular y molecular. Zonas anatómicas y función de los ganglio linfáticos: Abbas AK, Lichman AH, Pillai S *6th edición Elsevier Saunders* 58-61, 2000
- 32-** Infante JF, Sifones S, Pérez P, González P, Muñoz E Marrero O , Fariñas M: Toxicología de VA-DIFTET® por administración a dosis única en ratones. *Revista de toxicología , Asociación Española de toxicología* 15 (2) 59-63 1998
- 33-** Núñez JF, Herrera I, Infante JF, González P, Pérez V, Argamasilla M, *et al:* Estudiode toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 2006; 15 (2) 9-14.

Recibido: 13/06/14

Aceptado: 04/07/14