

ESTUDIO DE TOLERANCIA LOCAL DE UN CANDIDATO VACUNAL PROTEOLIPOSÓMICO CONTRA *LEPTOSPIRA SPP* EN EL BIOMODELO *MESOCRICETUS AURATUS*

STUDY OF LOCAL TOLERANCE OF A PROTEOLIPOSOME VACCINE CANDIDATE AGAINST *LEPTOSPIRA SPP* IN *MESOCRICETUS AURATUS* AS BIOMODEL

LUIS ALFREDO ROSARIO FERNÁNDEZ^{1*}, DANIEL FRANCISCO ARENCIBIA ARREBOLA^{2*}; JUAN FRANCISCO INFANTE BOURZAC³, YOLANDA EMILIA SUÁREZ FERNÁNDEZ⁴, BEATRIZ TAMARGO SANTOS¹, VICTORIANO GUSTAVO SIERRA GONZÁLES³, NIURKA BATISTA SANTIESTEBAN³

¹Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL-U.H). Calle 222 e/ 25 y 27, La Lisa. Habana, Cuba.

²Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Calle 200 e/ 17 y 19, Playa. Habana, Cuba.

³Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Playa. Habana, Cuba.

⁴Universidad Agraria de la Habana. San José a carretera Tapaste, San José. Mayabeque, Cuba.

*Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Calle 200 e/ 17 y 19, Playa. Habana, Cuba.

Código Postal 11600, Apartado Postal 16065. email: lrosario@ifal.uh.cu, darrebola@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 desventajas las reacciones de hipersensibilidad a los componentes de las formulaciones y la alta frecuencia de toxicidad en el sitio de inoculación. En el presente trabajo fue evaluada la tolerancia local en el punto de inoculación generada por una nueva formulación vacunal proteoliposómica contra *Leptospira spp.* en el biomodelo el *Mesocricetus auratus*. Para ello los animales (ambos sexos) fueron inoculados dos veces por vía intramuscular, con 21 días entre la primera y la segunda inoculación. Seguidamente se realizaron eutanasias seriadas a los 3 días y luego semanalmente hasta 49 días de la primera inoculación. Los resultados demostraron la ausencia de muertes y de diferencias estadísticas en las variables: peso corporal, consumo de agua y alimentos entre animales inmunizados y controles negativos. Tampoco se detectaron lesiones macroscópicas en órganos y tejidos de importancia toxicológica en los animales inmunizados con el candidato vacunal. Las lesiones locales encontradas obedecen a la respuesta inmunológica generada por esta nueva formulación vacunal. La relevancia inmunológica del biomodelo se comprobó mediante la determinación de anticuerpos IgG en el grupo de animales vacunados. En función de los resultados obtenidos se concluye que el candidato vacunal evaluado no fue potencialmente tóxico al sitio de inoculación al ser administrado por vía intramuscular en el biomodelo *Mesocricetus auratus*.

Palabras clave: Hámster Sirio, *Leptospira*, proteoliposoma, tolerancia local, toxicidad.

ABSTRACT

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 at inoculation site. In this paper it is discussed the local toxicity at inoculation site elicited by a proteoliposome

vaccine candidate obtained from outer membrane cell wall of *Leptospira spp* using the *Mesocricetus auratus* as biomodel. The experimental animals (both sexes) were inoculated with two doses of vaccine candidate (21 days between them) via intramuscular. The results obtained did not show statistical differences among immunized and animal controls for the variables: corporal weight, water and food intake. Neither macroscopic lesions of toxicological importance were observed. The histopathological findings describes are part of immunological response consequence against vaccine candidate. Besides the immunological relevance of the biomodel was check by means of IgG quantification. 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 at inoculation site.

Keywords: Hamster Sirio, *Leptospira*, local tolerance, proteoliposome, toxicity.

Recibido: 20.11.12. Revisado: 21.11.12. Aceptado: 29.11.12.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una de las zoonosis bacterianas más difundidas en el mundo (OPS, 2005; OPS, 2009). El agente causal de esta enfermedad es una espiroqueta Gram negativa perteneciente a la familia Leptospiraceae, la cual se agrupa 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 *et al.*, 2005; Levett *et al.*, 2006).

En Cuba existe un programa de lucha contra la leptospirosis que incluye la vacunación profiláctica para humanos y animales. Estas vacunas son de células enteras inactivadas, con o sin adyuvante, e 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 especialmente en el punto de inoculación debido a la presencia de adyuvantes como el hidróxido de aluminio (McBride *et al.*, 2005).

Las desventajas anteriormente descritas constituyen un permanente desafío para productores y comercializadores, así como para la evaluación de la eficacia de las vacunas antileptospirósicas en nuevos mercados. Con el objetivo de 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 que han demostrado ser una estrategia atractiva para generar futuros candidatos vacunales debido a la homología y conservación entre los diferentes serovares lo cual genera en el hospedero protección cruzada (Cullen *et al.*, 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 *et al.*, 2011; Tamargo *et al.*, 2012). En las evaluaciones preclínicas el mismo ha resultado ser muy inmunogénico y protector contra los principales serovares de interés epidemiológico en Cuba (Mozdok, Canicola, Copenhageni, Ballum) (Rosario *et al.*, 2011; Tamargo *et al.*, 2012; Rosario *et al.*, 2012). Además ha demostrado no ser tóxico en dosis única administrado por vía intramuscular en el biomodelo *Mesocricetus auratus* de ambos sexos (Rosario *et al.*, 2012a).

Para continuar evaluando la seguridad del nuevo candidato vacunal en el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la toxicidad local de esta nueva formulación contra *Leptospira spp.* en el punto de inoculación siguiendo el esquema de dosis repetida según los protocolos establecidos para la vacunación en humanos mediante un estudio de tolerancia local utilizando como biomodelo el *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 51-54 g en ambos sexos. Los mismos fueron suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio 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 y alimentación

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. Se les suministró pienso de roedores, todo propósito, esterilizable, que no requiere suplemento dietético: fórmula EMO1002, con número de lote 1181102, suministrado por el 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 2 evaluaciones clínicas diarias hasta el final del estudio. En el ensayo se incluyeron animales no inmunizados que permitió no sólo el control de las condiciones de inmunización, sino también de los posibles efectos adversos potenciales que pudieran desarrollarse en el curso del experimento. Se inocularon dos dosis separadas de 21 días empleando la vía intramuscular por ser la propuesta para uso humano, en la región media posterior de la cara interna del muslo izquierdo y se realizaron eutanasias a diferentes tiempos (Rosario *et al.*, 2011; Tarmargo *et al.*, 2012), siendo estudiados histológicamente los tejidos expuestos directamente al producto. La administración del producto se realizó en horas tempranas de la mañana, entre las 9:00 y las 11:00 a.m.

Estudio de tolerancia local

El estudio de tolerancia local tuvo la finalidad de evaluar los efectos adversos locales potenciales asociados a la administración del producto (Fariñas *et al.*, 2009). 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 (Diehl *et al.*, 2001). 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 (Diehl *et al.*, 2001). Además se tuvo en cuenta que se administró el

máximo volumen permisible teniendo en cuenta la especie, peso y vía de administración (Diehl *et al.*, 2001). Este estudio tuvo una duración de 49 días con el objetivo de que se evaluara la tolerancia local al producto 49 días después de la primera dosis

y 28 días después de la segunda dosis como tiempo mínimo para estudiar la tolerancia de vacunas (EMEA, 2002). Se formaron 3 grupos de tratamiento. El diseño de los grupos experimentales fue el siguiente descrito en la tabla I.

Tabla I. Diseño Experimental Estudio de Tolerancia Local.

SEXO	GRUPO	N	Días /N de eutanasias							
			3	7	14	21*	28	35	42	49
Hembras	Control	40	5	5	5	5	5	5	5	5
	Placebo	40	5	5	5	5	5	5	5	5
	Vacuna	40	5	5	5	5	5	5	5	5
Machos	Control	40	5	5	5	5	5	5	5	5
	Placebo	40	5	5	5	5	5	5	5	5
	Vacuna	40	5	5	5	5	5	5	5	5

*Tiempo en que se administró la segunda dosis.

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 colaboradores (Tamargo *et al.*, 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 *et al.*, 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

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 (EMEA, 2002). En punto de inoculación se tuvo en cuenta en cada animal la aparición de rubor, dolor, hiperemia y supuración (EMEA, 2002).

Relevancia del biomodelo experimental

La relevancia del biomodelo fue demostrada mediante la respuesta de anticuerpos IgG inducida por la preparación vacunal frente al antígeno homólogo. Esta respuesta fue evaluada en suero de sangre periférica, cada 7 días desde el inicio hasta el final del experimento (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49) para ambos sexos mediante un sistema ELISA indirecto cuantitativo (Palaniappan *et al.*, 2004). La sangre fue extraída por la vena safena de los animales previamente anestesiados con una inyección intraperitoneal con 100µL de ketamina (10 mg/mL)/xylazina (1mg/mL) por cada 130 g de peso corporal (Diehl *et al.*, 2001).

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, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días (Fariñas *et al.*, 2009; EMEA, 2002).

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 (Fariñas *et al.*, 2009; EMEA, 2002).

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 (Fariñas *et al.*, 2009; EMEA, 2002).

Estudios anatomopatológicos

Se tomaron muestras del sitio de inoculación de todos los animales a 5 animales/grupo/sexo a los 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días de inoculado el candidato vacunal teniendo en cuenta que a los 21 días se administró la segunda dosis por tanto las muestras tomadas de los días 28, 35, 42 y 49 corresponden a tales días de la primera dosis pero a los 7, 14, 21 y 28 días de la segunda dosis. Se tomó piel, tejido celular subcutáneo, músculo de la región y ganglio linfático poplíteo (EMEA, 2002). Fue previsto el examen histopatológico para todos los órganos que mostraran alteraciones macroscópicas en la necropsia (EMEA, 2002). 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.

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) (AVMA, 2007). Además durante todo el estudio se respetaron los principios éticos para el uso de animales de laboratorio en experimentación (CCAC, 1997; 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 $p \leq 0,05$, excepto para las variables categóricas que se consideró significativo un valor de $p \leq 0,01$. Para las variables continuas (respuesta de IgG, 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. Para el caso de las variables categóricas (síntomas clínicos, lesiones macro y micro en órganos y tolerancia local) se utilizó la prueba no paramétrica de probabilidad exacta de Fisher de una cola. En todos los casos las comparaciones fueron contra el grupo control.

RESULTADOS

Relevancia del biomodelo experimental

Los resultados observados en la figura 1 A y B demuestran la respuesta inmunológica generada por el candidato vacunal a dosis de 0,2 mL. La caída de la respuesta inmunológica fue a los 21 días como esta descrito según los resultados de los estudios de inmunogenicidad. En todos los tiempos hubo diferencias significativas entre el grupo inmunizado con el candidato vacunal y los grupos control y placebo, para ambos sexos. Reafirmando la relevancia del biomodelo experimental.

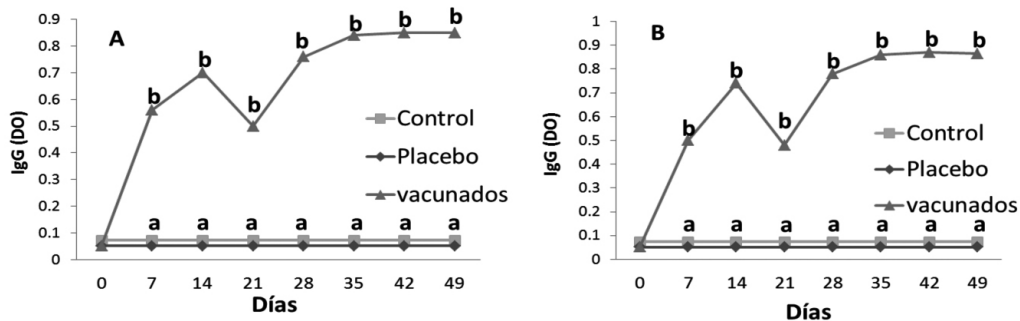


Figura 1 A (machos) y B (hembras). Respuesta de anticuerpos IgG inducidos por la formulación vacunal en el biomodelo *Mesocricetus auratus*. Las letras representan la comparación múltiple de medias realizada mediante el test de Tukey, letras diferentes difieren para $p \leq 0,05$.

Observaciones clínicas y mortalidad

En la tabla II se observan los resultados encontrados en la región de inoculación del candidato vacunal. El rubor y la hiperemia fueron los hallazgos clínicos encontrados tanto a las 24-72 horas de inoculación de la primera dosis como de la segunda dosis 21 días después de la primera inoculación.

Estos efectos no difirieron respecto al grupo control, ya que de un total de 40 animales tratados con el candidato vacunal sólo en un animal se encontró rubor en hembras y machos. En ningún animal se encontró síntomas de dolor y de supuración. No hubo muertes durante el transcurso del ensayo (7 semanas).

Tabla II. Observación clínica de efectos locales en el punto de inoculación del candidato vacunal en el bio-modelo *Mesocricetus auratus*.

Grupos Experimentales	Rubor	Dolor	Hiperemia	Supuración
24-72 horas después de la primera dosis				
Machos				
Control	0/40	0/40	0/40	0/40
Placebo	1/40(2,50%)	0/40	1/40(2,50%)	0/40
Vacunados	1/40(2,50%)	0/40	1/40(2,50%)	0/40
Hembras				
Control	0/40	0/40	0/40	0/40
Placebo	1/40(2,50%)	0/40	0/40	0/40
Vacunados	1/40(2,50%)	0/40	1/40(2,50%)	0/40
24-72 horas después de la segunda dosis				
Machos				
Control	0/20	0/20	0/20	0/20
Placebo	0/20	0/20	0/20	0/20
Vacunados	1/20(5,00%)	0/20	0/20	0/20
Hembras				
Control	0/20	0/20	0/20	0/20
Placebo	0/20	0/20	0/20	0/20
Vacunados	1/20(5,00%)	0/20	0/20	0/20

Comparación contra el control. Prueba no paramétrica de probabilidad exacta de Fisher de una cola, $p \leq 0,01$.

Peso corporal

La figura 2 A y B muestran el efecto de la inoculación de dos dosis del candidato vacunal en el peso corporal de hámsteres de ambos sexos. Los machos comenzaron el ensayo con un peso promedio de 55 g y al finalizar el estudio pesaban como promedio 142 g, con un incremento de peso de 87 g en 7 semanas, para un incremento promedio de 12,4 g por semana. Para el caso de las

hembras el peso corporal inicial fue de 50 g y al finalizar el estudio el peso tomó valores de 130 g como promedio. El incremento de peso en las hembras fue de 80 g en 7 semanas para un promedio de 11,4 g por semana. No hubo diferencias significativas entre controles e inmunizados en ninguna de las 9 mediciones del peso corporal, para ambos sexos. Además no hubo incremento de peso a los 3 días de inoculado el candidato vacunal.

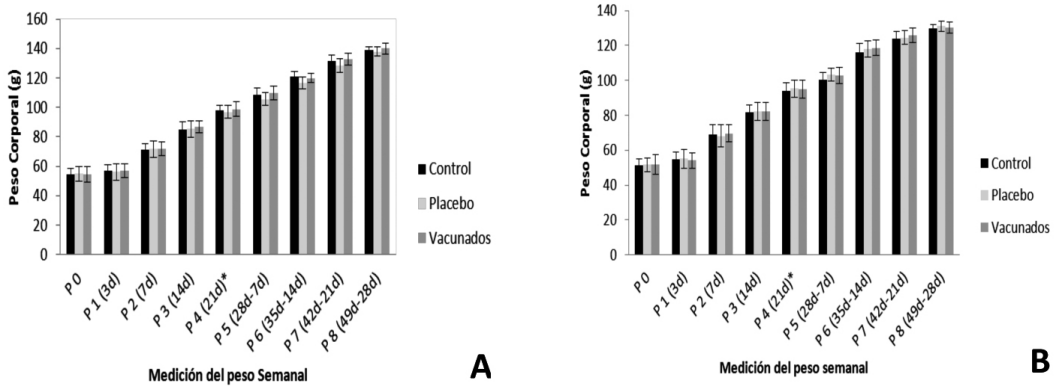


Figura 2 A (machos) y B (hembras). Efecto del candidato vacunal en el peso corporal utilizando el *Mesocricetus auratus* como biomodelo.

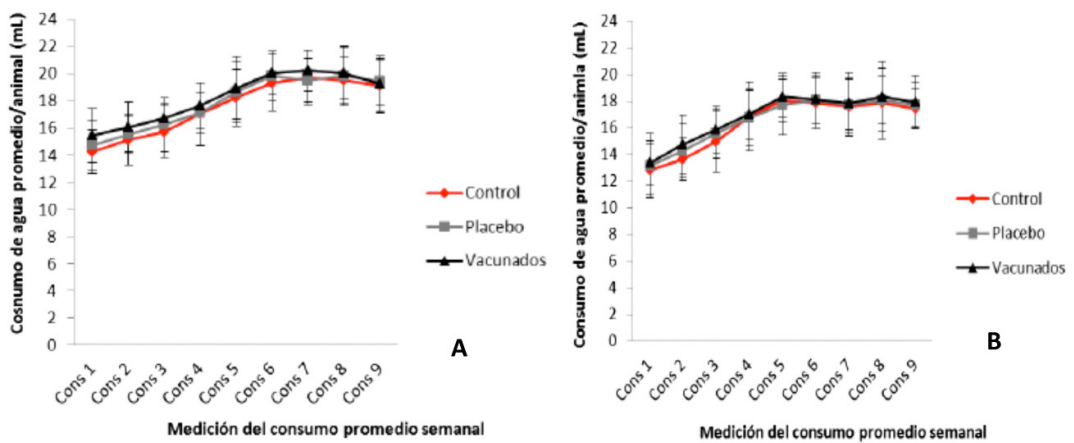


Figura 3 A (machos) y B (hembras). Efecto del candidato vacunal en el consumo de agua utilizando el *Mesocricetus auratus* como biomodelo.

Consumo de agua

En la figura 3 A y B se muestran los resultados del consumo de agua. Los machos consumieron como promedio entre 15 y 19 mL de agua, mientras que el consumo en las hembras fue inferior estando entre 13

y 18 mL. No hubo diferencias estadísticas entre en lo referente al promedio del consumo semanal de agua por animal, tampoco difirieron los animales del grupo placebo con los animales inmunizados con el candidato vacunal y controles. Aunque el consumo de agua en los machos fue algo superior

a las hembras los resultados promedios entre sexos no difirieron durante los 49 días de duración del experimento.

Consumo de alimentos

Los resultados del efecto de la inoculación del candidato vacunal en el consumo de alimento (figura 4 A y B), se observa que hubo un incremento del consumo de alimento durante el ensayo, lo que corrobora que no

hubiese diferencias significativas entre los pesos teniendo en cuenta el mismo sexo. No hubo diferencias entre inmunizados y controles en el consumo promedio/animal evaluado semanalmente teniendo en cuenta el mismo sexo. Los machos consumieron entre 6-10 g de pienso como promedio, con un incremento promedio del consumo de 0,44 g. Por su parte las hembras consumieron entre 4,8-9 g, con un incremento promedio del consumo de alimento de 0,47 g.

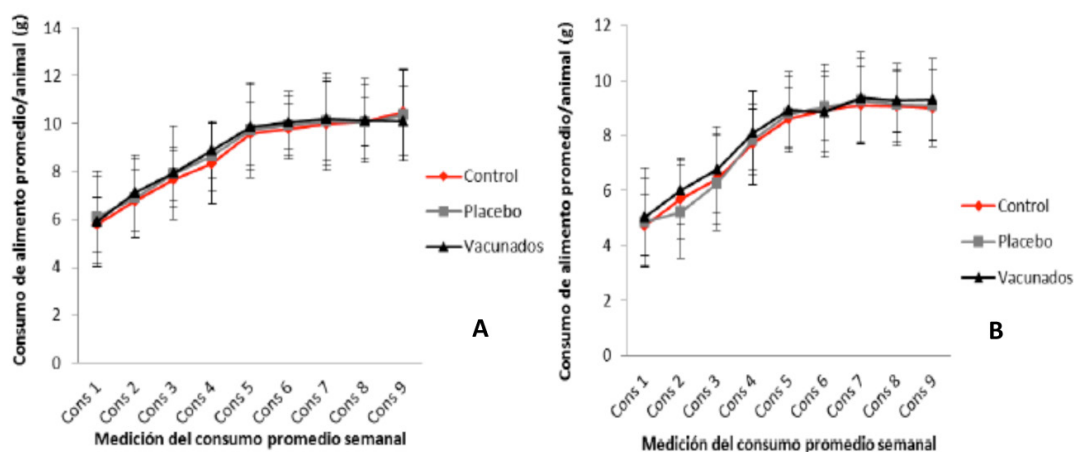


Figura 4 A (machos) y B (hembras). Efecto del candidato vacunal en el consumo de alimento utilizando el *Mesocricetus auratus* como biomodelo.

Estudio de tolerancia local

Al realizar la necropsia de forma seriada no se encontraron lesiones macroscópicas en tejidos y órganos de interés toxicológico, siendo esto válido para todos los grupos experimentales en ambos sexos. Se prestó especial atención a las observaciones macroscópicas de los órganos del sistema in-

mune donde tampoco se observaron lesiones de interés toxicológico que debieran ser analizadas histopatológicamente. Por tanto sólo se presentan los resultados de los hallazgos histopatológicos en el punto de inoculación en muestras de piel, tejido celular subcutáneo, músculo de la región y ganglio linfático poplíteo (tabla III).

Tabla III. Hallazgos histopatológicos en el punto de inoculación en muestras de piel, tejido celular subcutáneo, músculo de la región y ganglio linfático poplíteo en el biomodelo *Mesocricetus auratus* de ambos sexos.

Días post-inoculación	Alteraciones observadas	Sexo	Vacunados	Placebos	Controles
7	Proceso de reparación con fibrosis lineal en músculo.	M	1/5(20%)	0/5	1/5(20%)
28	Discreto proceso inflamatorio subagudo en el músculo.	M	3/5(60%)	0/5	0/5
28	Discreto proceso inflamatorio subagudo en el músculo.	H	2/5(40%)	0/5	0/5
28	Proceso de reparación fibrosis lineal en músculo.	H	1/5(20%)	1/5(20%)	1/5(20%)
42	Folículos secundarios subcapsulares en el ganglio linfático regional.	H	4/5(80%)*	0/5	0/5
42	Folículos secundarios subcapsulares en el ganglio linfático regional.	M	4/5(80%)*	0/5	0/5

Comparación contra el control. Prueba no paramétrica de probabilidad exacta de Fisher de una cola, * $p \leq 0,01$.

En general los hallazgos histopatológicos encontrados estuvieron clasificados en tres grupos. El primero fue un proceso de reparación con fibrosis lineal en músculo siendo observado el día 7 post inoculación de la primera dosis en un macho del grupo inmunizado con el candidato vacunal y en un macho del grupo control. Esta lesión fue observada también el día 28 post inoculación de la primera dosis y 7 días de la segunda dosis en tres animales hembras de los grupos inmunizados con el candidato vacunal, control y placebo respectivamente.

El segundo hallazgo clasificado fue un discreto proceso inflamatorio subagudo en el músculo, el cual fue observado en tres animales machos y dos hembras del grupo inmunizado con el candidato vacunal a los 28 días de la primera inoculación y 7 días de la segunda inoculación.

El tercer y último grupo estuvo representado por la presencia de folículos secundarios subcapsulares en el ganglio linfático regional. Este estuvo presente en 4 animales machos y 4 hembras del grupo vacunado a

los 42 días de la primera inoculación y 21 días de la segunda inoculación. Esta lesión local fue la única que difirió entre inmunizados con el candidato vacunal y los grupos placebo/controles. En estos últimos este hallazgo no fue observado.

En la figura 5 A, B, C se observa la presencia del proceso de reparación del músculo con tejido fibroso en forma lineal. En tanto en la figura 6 A y B es evidente el proceso inflamatorio subagudo en músculo de animales vacunados. Se observa una gran conglomeración de leucocitos con células de tipo nucleada presentes en todo el sitio de inoculación (ver flecha de la figura 6 B). En la figura 7 A y B se observan los folículos secundarios subcapsulares en todo el borde del ganglio linfático poplíteo. Los folículos subcapsulares son representados por formaciones redondeadas de forma blanquecina con un pequeño borde irregular, ubicados subcapsularmente o hacia la región periférica del ganglio como se observa en la figura 7 A.

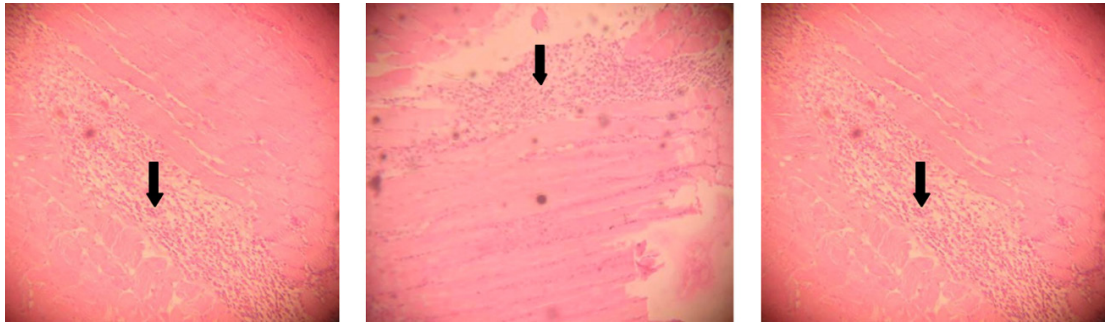


Figura 5 (A, B, C). Proceso de reparación con fibrosis lineal en músculo de animales vacunados (A y B), animal control (C) (ver flechas). Magnificación: 20 X.

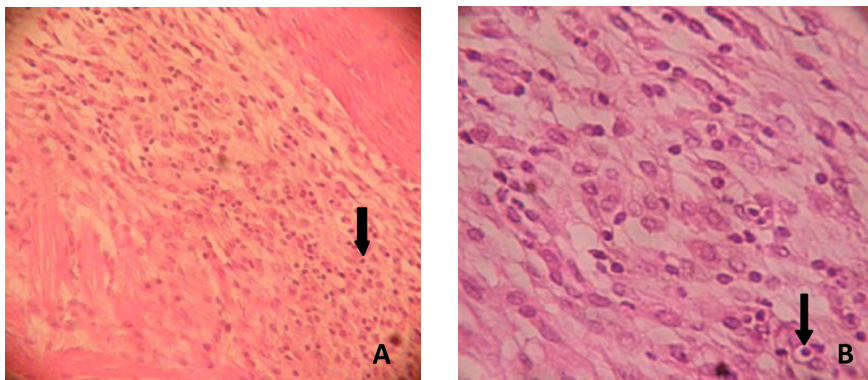


Figura 6 (A y B). Discreto proceso inflamatorio subagudo en el músculo de animales vacunados (ver flechas). Magnificación: 40 X.

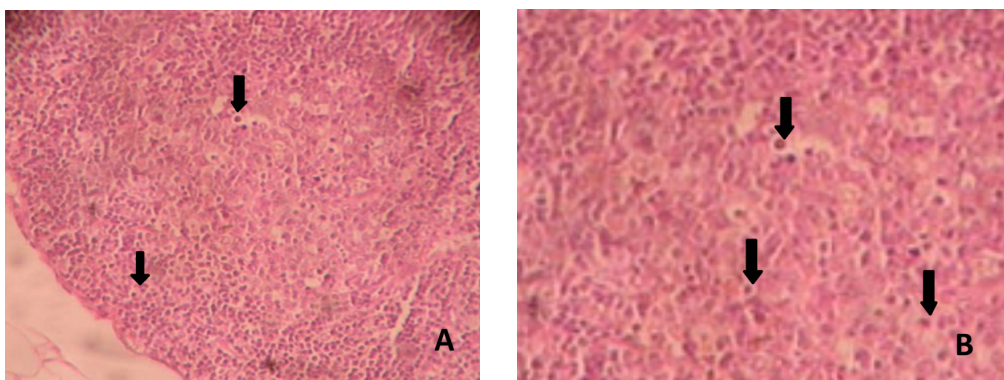


Figura 7 (A y B). Folicúlos secundarios subcapsulares en el ganglio linfático regional de animales vacunados (ver flechas). Magnificación: 40 X.

DISCUSIÓN

Las vacunas proteoliposómicas se han destacado por ser productos biofarmacéuticos bien tolerados por el sistema inmunológico del hospedero, capaces además de inducir signos clínicos de inflamación por periodos de tiempo de aproximadamente 48 horas post-inoculación (Infante *et al.*, 2012). En nuestra experiencia se observó sólo en un pequeño número de animales tanto rubor como hiperemia, ambos signos de inflamación generados por la respuesta del sistema inmune (Infante *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2012). Durante el ensayo no hubo muertes, hecho que por sí solo destaca la no toxicidad sistémica del candidato vacunal, resultados que concuerdan con los hallados en el ensayo de dosis única, donde no se manifestaron signos y síntomas de toxicidad, ni tampoco hubo muertes (Rosario *et al.*, 2012a). Además tampoco se encontraron lesiones macroscópicas en órganos y tejidos de interés toxicológico (Rosario *et al.*, 2012a).

Debido a que la mayoría de los candidatos vacunales que se obtienen a partir de microorganismos Gram negativos, como es el caso de *Leptospira*, producen signos clínicos de inflamación, este tipo de respuesta y su duración dependen del tipo de vacuna. Este hecho unido a la no observación de animales con supuración y dolor puede ser explicado a través de cuatro factores fundamentales: 1) La tecnología de obtención de la vacuna, ya que las tecnologías proteoliposómicas limpian las formulaciones de detritos celulares, 2) El otro factor lo constituye el medio en que se fermenta el microorganismo para obtener la biomasa el cual es libre de proteínas, 3) Además, la ausencia de adyuvantes siendo reconocido que el mayor por ciento de los efectos tóxicos de una vacuna está dado por la sustancia utilizada como potenciadora de la respuesta inmune (Infante *et al.*, 2004) y, por

último, 4) las características intrínsecas del microorganismo, ya que el LPs de *Leptospira* es 100 veces menos toxigénico que el de *E. coli* (Faine *et al.*, 1999).

La dinámica de la respuesta debe ser explorada siempre que se administre en dosis repetidas, pues, aunque se utilice el mismo biomodelo experimental que en los estudios de inmunogenicidad, no se debe inferir que será la misma respuesta en cuanto a intensidad y duración. En este caso los animales del grupo vacunado experimentaron altos títulos de anticuerpos anti IgG en ambos sexos, al diferir con controles y placebos, lo que demuestra la relevancia del biomodelo empleado. Mediante este ensayo no sólo se infiere que el candidato vacunal ensayado no es tóxico a nivel local sino que también es capaz de generar a altas dosis una respuesta similar a la encontrada en los ensayos de inmunogenicidad y que esta respuesta es duradera en el tiempo.

Además en el día 21 post-inoculación, al igual que en los ensayos de inmunogenicidad, se hace evidente una disminución de la respuesta, siendo necesario amplificar mediante un booster la misma para que sea más duradera. Estos resultados demuestran que el candidato vacunal es efectivo y no induce signos de toxicidad en el sitio de inoculación en un biomodelo relevante (Silva *et al.*, 2007; Rosario *et al.*, 2011; Tamargo *et al.*, 2012; Rosario *et al.*, 2012; Rosario *et al.*, 2012a).

El análisis del peso corporal corrobora también la inocuidad de este candidato vacunal, pues no hubo diferencias entre vacunados y controles, en ninguno de los tiempos en que fue medido el peso corporal tal como fue observado en el ensayos a dosis única (Rosario *et al.*, 2012a). Los resultados de la curva de aumento de peso para esta especie y sexo concuerdan con los obtenidos por Gattermann y colaboradores (Gattermann *et al.*, 2002). 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 dos dosis altas del candidato vacunal en estudio no resultó ser tóxica en las condiciones ensayadas. Resultados que concuerdan con el estudio de tolerancia local de la vacuna antileptospirósica vax-Spiral®, vacuna de células enteras evaluada en ratas Sprague Dawley como biomodelo (Infante *et al.*, 2004). Para el caso de los resultados del consumo de agua, también se mantuvo con valores similares entre controles y tratados para ambos sexos. 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 *et al.*, 2001). 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 colaboradores (Gattermann *et al.*, 2002), 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 *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2001; Infante *et al.*, 2004).

En este estudio no se encontraron lesiones macroscópicas de interés toxicológico, tampoco se encontraron lesiones en órganos

del sistema inmune como el bazo y el timo. Pero a nivel local sí hubo respuesta del sistema inmune. Los procesos de reparación con fibrosis lineal en músculo encontrados pudieran estar relacionados con el trayecto de algún objeto punzante durante la inoculación, como las agujas hipodérmicas, debido al traumatismo ocasionado por estos objetos al lesionar los vasos sanguíneos del tejido donde se practica la inyección y que han sido observados en ensayos similares en ratas Sprague Dawley y ratones Balb/c (Infante *et al.*, 2001; Infante *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2012). El hecho de que se hayan encontrado en animales controles y placebos demuestra nuestra teoría además descarta la idea de que la causa de esta lesión sea inmunológica. Además por lo general los procesos de fibrosis de músculo si no están dados por causas mecánicas suelen demorar en aparecer, y no son observados con tanta claridad como lo demuestran las figuras 5 A, B y C, y en dos del total de casos con esta lesión, siendo observado a los 7 días de inoculadas las sustancias a prueba.

El discreto proceso inflamatorio subagudo en músculo pudiera tener la misma causa de la fibrosis lineal (mecánica), pues en este tipo de lesión se describe la presencia de inflamación aguda con infiltrado celular (Shayne, 2003). Pero no fue observada esta lesión en los animales controles y tampoco en los placebos. Por lo que en este caso en particular parece estar vinculado a la respuesta local del sistema inmune frente al antígeno inoculado. Además se describe este tipo de lesión formada por infiltrado a base de células redondas comúnmente encontrada en las regiones periféricas al sitio de inoculación de la sustancia a prueba, pero no debemos descartar que este fenómeno es también observado con alta frecuencia en procesos traumáticos por punción de agujas hipodérmicas siendo observada en otros ensayos de tolerancia local de vacunas de

células enteras y de vesículas de membrana externa (Infante *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2012).

Por su parte la presencia de folículos secundarios subcapsulares en el ganglio linfático regional sí pudiera ser considerado un proceso de origen inmunológico (Steven *et al.*, 2002; Infante *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2006; Abbas, 2007; Infante *et al.*, 2012), además este hallazgo histopatológico sólo fue observado en animales vacunados con una alta frecuencia de aparición en este grupo difiriendo con los controles y placebos. El hecho de que se haya encontrado sólo en el tiempo 42 reafirma el sentido de la respuesta inmunológica, ya que es una respuesta secundaria y de memoria pues ya en este tiempo se han realizado las dos inoculaciones del candidato vacunal.

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 (Steven *et al.*, 2002; Abbas, 2007). 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 contienen centro germinal en su interior se denominan secundarios (Steven *et al.*, 2002; Abbas, 2007) (ver figura 7 A y B). Los folículos de los ganglios linfáticos son la llamada región de los linfocitos B. Los folículos primarios contienen fundamentalmente linfocitos B vírgenes maduros (Steven *et al.*, 2002; Abbas, 2007). Sin embargo los centros germinales presentes en los folículos secundarios surgen a raíz de la estimulación antigénica y representan lugares de notable proliferación para linfocitos B (Steven *et al.*, 2002; Abbas, 2007). En estos lugares es donde ocurre la selección de aquellas células que producen los anticuerpos de alta afinidad y la generación de

los linfocitos B de memoria (Steven *et al.*, 2002; Abbas, 2007).

Dadas estas consideraciones concluimos que bajo nuestras condiciones experimentales y según los criterios establecidos, el candidato vacunal en estudio no evidenció efectos adversos toxicológicos locales en el modelo animal usado, siendo bien tolerado por éstos al ser aplicado por vía intramuscular en dos dosis separadas de 21 días, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- OPS (2005), 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. Disponible en: URL: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rimsa14-18-s.pdf> [Consultado enero 2009].
- OPS (2009), Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades desatendidas: Enfermedades de la pobreza. Disponible en: URL: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.htm> [Consultado enero 2009].
- ADLER, B. and DE LA PEÑA, M. (2009), *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol.*, 2: 4382-4392.
- MCBRIDE, A., ATHANAZIO, D., REIS, M., and KO, A. (2005), Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.*, 18: 376-386.
- LEVETT, P., MOREY, R., GALLOWAY, R., and STEIGERWALT, A. (2006), *Leptospira broomii* sp. nov, isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56: 671-673.
- CULLEN, P.A., HAAKE, D.A., and ADLER, B. (2004), Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev.*, 28: 291-318.
- ROSARIO, L.A., SUAREZ, Y.E., VALDÉS, Y., and BATISTA, N. (2011), 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". 72-73.
- TAMARGO, B., ROSARIO, L.A., BATISTA, N., ARENCIBIA, D.F., FERNÁNDEZ, K., VILLEGAS, A., AYALA, J.A., and SIERRA, V.G. (2012), Protección inducida por nanocoleatos derivados de proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *VacciMonitor.*, 21: 3-9.
- ROSARIO, L.A., ARENCIBIA, D.F., SUÁREZ, Y.E., INFANTE, J.F., VALDÉS, B.Y., and BATISTA, N. (2012), Cross-protection among unrelated *Leptospira* pathogens serovars: an unfinished store. *Advances in Clinical and Experimental Medicine.*, 21: 581-589.
- ROSARIO, L.A., ARENCIBIA, D.F., SUÁREZ, Y.E., INFANTE, J.F., TAMARGO, B., SIERRA, G., and BATISTA, N. (2012a), Toxicidad a dosis única de un candidato vacunal proteoliposómico contra *Leptospira spp* en el biomodelo *Mesocricetus auratus*. *Retel.*, 38: 17-31.
- FARIÑAS, M., ARENCIBIA, D.F., LÓPEZ, Y., DÍAZ, D., SIFONTES, S., and INFANTE, J.F. (2009), Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay. *Retel.*, 24: 40-54.
- DIEHL, K., HULL, R., MORTON, D., PFISTER, R., RABEMAMPANINA, Y., SMITH, D., VIDAL, J.M., and VORSTENBOSCH, C. (2001), A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.*, 21: 15-23.
- EMEA (2002), European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. CPMP/SWP/2145/00. London, 1-6.
- FAISAL, S.M., KHAN, M.A., NASTI, T.H., AHMAD, N., and MOHAMMAD, O. (2003), Antigen entrapped in the escheriosomes leads to the generation of CD4(+) helper and CD8(+) cytotoxic T cell response. *Vaccine.* 21: 2383-2393.
- PALANIAPPAN, R.U., CHANG, Y.F., HASSAN, F., MCDONOUGH, S.P., POUGH, M., and BARR, S.C. (2004), Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol.*, 53: 975-984.
- AVMA (2007), American Veterinary Medical Association. Guidelines on Euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia. USA, 1-39.
- CCAC (1997), Canadian Council on Animal Care Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa, 155-162.
- INFANTE, J.F., SIFONTES, S., ARENCIBIA, D.F., HERNÁNDEZ, T., FARIÑAS, M., and PÉREZ, O. (2012), Toxicological assessment of the cochleate derived from *Neisseria meningitidis* proteoliposome in Sprague Dawley rats. *North American Journal of Medical Sciences.*, 4: 135-140.
- INFANTE, J.F., SIFONTES, S., ÁLVAREZ, E., GONZÁLEZ, M., PÉREZ, V., SOSA, E., FARIÑAS, M., NÚÑEZ, J.F., HERNÁNDEZ, T., and TORRES, V. (2004), Evaluación de la toxicidad por dosis única y tolerancia local de la vacuna vax-SPIRAL® en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor.*, 13: 11-16.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., and PEROLAT, P. (1999), *Leptospira* and leptospirosis. *Medisci, Melbourne.*, 43: 23-24.
- SILVA, E., MEDIEROS, M.A., MC BRIDE, A.J., MATASUNGA, J., ESTEVES, G.S., and RAMOS, J.G. (2007), The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein Lig A confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine.*, 25: 6277-6286.
- GATTERMANN, P., FRITZSCHE, R., WEINANDY, W., and NEUMANN, K. (2002), Comparative studies of body mass, body measurements and organ weights of wild-derived and laboratory golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory Animals.*, 36: 445-454.
- SHAYNE CG (2007), *Animal Models in toxi-*

- cology. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. Toxicology: Chapter 4. The Hamster, 2nd edition, (LLC eds), New York. 277-312.
- INFANTE, J.F., SIFONTES, S., MUÑOZ, E., GONZÁLEZ, M., PÉREZ, V., BALDOR, C., and FARIÑAS, M. (2001), Prueba toxicológica en ratones de una sola dosis inicial segura de la vacuna cubana antileptospirosis vax-SPIRAL. *Biología Aplicada*, 18: 20-23.
- NÚÑEZ, J.F., HERRERA, L., INFANTE, J.F., GONZÁLEZ, P., PÉREZ, V., and ARGAMASILLA, M. (2006), Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *Vaccinología*, 15: 9-14.
- STEVEN F (2002), Vertebrate Immunity. In: Steven F. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton University Press. New Jersey, 13-22.
- ABBAS A.K (2007), Maturation, Activation and Regulation of Lymphocytes. Immunological tolerance. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, 243-263.