

Determinación del potencial irritante de un candidato vacunal nasal que combina al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B con el antígeno de la nucleocápsida

✉ Delia N Porras¹, Karelia Cosme¹, Lizet Aldana¹, Dania Bacardí¹, Nelson Merino², Carmen Valenzuela¹, Lorelys Milá¹, José Suárez¹, Rubén Amaya¹, Ariel Vázquez¹, José García¹, Yadira Lobaina¹, Mabel Alonso¹, Julio Aguilar¹, Verena Muzio¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, CP 10600, La Habana, Cuba
Fax: (5-37) 33 6008; E-mail: tania.porras@cigb.edu.cu

²Departamento de Anatomía Patológica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana
Calle 222 y Ave. 23, La Coronela, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) es el ingrediente farmacéutico activo de la vacuna cubana contra esta enfermedad, la cual ha demostrado altos índices de eficacia y seguridad. HBsAg ha sido combinado con el antígeno de la nucleocápsida o core (HBcAg) obtenido por la expresión de la proteína en *E. coli*, dando lugar a un candidato vacunal cuya administración por vía intranasal promete incrementar las ventajas de la vacunación. Para demostrar la seguridad del candidato vacunal administrado por esta vía se debe comprobar que la inoculación no afecta la función protectora de la mucosa ni causa efectos adversos a nivel local. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial irritante de HBsAg-HBcAg, en ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron tratadas con diferentes dosis durante 5 días, siendo sacrificados éticamente el día 6 del estudio. Se determinó el índice de irritabilidad de acuerdo con un sistema de clasificación, en el cual se asignó una puntuación a signos clínicos como apariencia del epitelio, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema, determinados por evaluación histológica de muestras de mucosa nasal, pulmones y cerebro. No fueron reportados animales con alteraciones clínicas o conductuales en ninguna de las dosis. El índice de irritabilidad obtenido para todos los grupos de tratamientos reportó valores menores que 1, según la tabla de clasificación empleada. Estos resultados sugieren que el candidato vacunal HBsAg-HBcAg contra el virus de la hepatitis B aplicado por vía nasal, no produce alteraciones en los órganos estudiados y no es irritante para la mucosa nasal, en la cual no se evidenciaron daños locales.

Palabras claves: Administración intranasal, HBV, toxicidad local, irritabilidad nasal, HBsAg, HBcAg, vacuna mucosal

Biotecnología Aplicada 2004;21:143-147

ABSTRACT

Determination of assesment of the irritant potential of a nasal vaccine candidate, which combines Hepatitis B surface antigen and Hepatitis B core antigen. Hepatitis B virus antigen (HBsAg) is the pharmaceutical active ingredient of the Cuban Hepatitis B vaccine against this disease, which has demonstrated high rates of efficacy and safety. HBsAg has been combined with nucleocapside or Core antigen (HBcAg), obtained by expression in *E. coli*, giving rise to a vaccine candidate, whose administration via intranasal promises to increase vaccination advantages. In order to demonstrate the candidate vaccine's safety inoculation via intranasal it should prove not to cause adverse effects that might affect the protective function of the nasal mucose. The objective of this study was to determine the irritating potential of HBsAg-HBcAg in Sprague-Dawley rats, which were treated intranasally for 5 days with different dosages and sacrificed ethically on the 6th day. The irritability index was assigned according to a classification system, in which a score was granted to clinical signs as erythema, oedema, lymphoid tissue infiltration and vascular congestion, determined by histological evaluation of nasal mucose, lungs and brain samples. Neither clinical adverse signs, nor behavioral changes were reported in animals under the studied dose. The irritability index observed was lower than 1 in all treatment groups, not showing statistical differences regarding the control one. The obtained results suggest that HBsAg-HBcAg vaccine candidate administered by intranasal route is neither irritating nor induces local damages in the nasal mucose in rats.

Keywords: Intranasal administration, local toxicity, nasal irritability, HBsAg, HBcAg, mucosal vaccine

Introducción

El antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), obtenido por técnicas de ingeniería genética en la levadura *Pichia pastoris* constituye el ingrediente farmacéutico activo de la vacuna recombinante cubana contra la hepatitis B, HeberBiovac-HB[®], registrada nacionalmente desde 1990 [1], con la cual se han realizado numerosos estudios clínicos en Cuba y en

otros países [2-5]. Las tendencias actuales en el desarrollo de productos biofarmacéuticos han impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para el empleo del HBsAg, en diseños que incluyen formulaciones novedosas, esquemas de inmunización diferentes o rutas de administración no convencionales, como la vía mucosal.

1. CECMED, La Habana, Cuba. Expediente de Registro Sanitario No. 1. Marzo Regist Nos 1990;1335-10,1336-20.

La administración de vacunas por vía mucosal constituye un enfoque promisorio a partir de las ventajas que reporta sobre la inmunización parenteral comúnmente utilizada. Se ha comprobado que la inoculación por este tipo de ruta, específicamente por vía intranasal induce estimulación local de la respuesta mucosal mediada por IgA, repuesta celular de linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos T auxiliares CD4+ y de células "natural killer" [6]. A estas ventajas se suma el hecho de que la administración mucosal elimina el riesgo de infección asociado comúnmente con el uso de jeringuillas, disminuye la necesidad de personal calificado y abarata la logística de la vacunación [7].

La vía nasal ha sido empleada en la administración de vacunas, como FluMist™, producida por MedImmune Vaccines Inc., para la inmunización contra los virus influenza A y B, la cual se encuentra registrada en Estados Unidos. En 1997 se realizó el primer estudio en humanos que demostró que la vacunación por la ruta nasal con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) recombinante inducía la producción de anticuerpos IgA e IgG específicos, con pocos efectos adversos [8].

A partir de estas experiencias y de las ventajas descritas para esta ruta de administración, en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba, se han desarrollado nuevos candidatos vacunales contra la hepatitis B por vía intranasal, como el que combina HBsAg con el antígeno de la nucleocápsida o core del virus de la hepatitis B (HBcAg), obtenido en *E. coli* mediante la expresión del gen que lo codifica. Está comprobado que este antígeno es una excelente molécula "carrier" para antígenos homólogos y heterólogos [9-14] y que constituye un potente inmunógeno para animales de experimentación cuando es administrado por vía nasal [15]. Su efecto inmunopotenciador sobre el HBsAg cuando ambas moléculas son coadministradas ha sido comprobado en estudios utilizando ratones de la línea BALB/c [16].

Estos resultados hacen de la formulación de HBsAg-HBcAg un candidato vacunal atractivo para llevar a cabo estudios clínicos, antes de los cuales es necesario comprobar en modelos animales, entre otros aspectos, que la administración de este producto no causa efectos adversos a nivel local que alteren la función protectora de la mucosa. Con ese objetivo se diseñó un estudio en el cual se determinó el potencial irritante de HBsAg-HBcAg al ser inoculado en ratas por vía intranasal, cuyos resultados son expuestos en el presente trabajo.

Materiales y métodos

Sustancia de ensayo

El candidato vacunal HBsAg-HBcAg fue obtenido bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción (BPP) y suministrado por el Grupo de Desarrollo de Formulaciones del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, luego de realizados estudios en los que se comprobó su esterilidad, apirogenicidad, características organolépticas, pH, concentración de proteínas e inmunoidentificación según las especificaciones de calidad establecidas [17]. El producto fue formulado a razón de 0.1 mg/mL de HBsAg/0.1 mg/mL de HBcAg disueltos en solución de fosfato de sodio

8 mM, cloruro de sodio 140 mM y EDTA 6 mM en agua para inyección, cantidad suficiente para (csp) 0.5 mL, lo cual constituye la dosis terapéutica para humanos. Como placebo se utilizó la misma formulación preparada sin HBsAg-HBcAg.

Animales

El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Local. Se emplearon 30 ratas machos de la sublínea Cenp: SPRD ALY® (Sprague-Dawley) suministradas por la división de roedores gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), con un peso promedio de 195 g. A su llegada a la instalación los animales se examinaron clínicamente, se pesaron y alojaron de forma individual en cajas de makrolón (Tecnoplast, Italia) con lecho de bagazo de caña estéril. Se mantuvieron en observación durante 7 días antes del inicio de los estudios en condiciones ambientales controladas (temperatura entre 19 y 21 °C, humedad relativa promedio de 68% y ciclos luz-oscuridad de 12 horas), las cuales permanecieron constantes durante la fase experimental. El alimento estéril (ALY co, CENPALAB) fue suministrado diariamente a razón de 25 g por animal y el agua se suministró *at libitum*.

Diseño del experimento

Para el diseño de este estudio fueron utilizados elementos de la norma ISO 10993-10 [18] que describe pruebas *in vivo* de irritabilidad.

Se conformaron cinco grupos de tratamientos, de seis animales cada uno, seleccionados al azar mediante una lista generada por el programa *Aleator* [19]. Fueron administrados de la siguiente forma: grupo I, animales no tratados; grupo II, placebo; grupo III, dosis terapéutica calculada para ratas de 195 gramos de peso promedio (0.7 µg/kg); grupo IV, 10 veces la dosis terapéutica (7 µg/kg) y grupo V, 20 veces la dosis terapéutica (14 µg/kg).

Los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y administrados por vía intranasal a razón de 25 µL por fosa nasal, utilizando micropipeta (Gilson, Francia). Se realizaron observaciones clínicas diarias en busca de signos indicativos de efectos adversos relacionados con la sustancia en estudio. El peso corporal fue controlado los días 0, 1 y 6 del estudio y diariamente el consumo de alimento. Veinticuatro horas después de la primera administración, fueron sacrificados tres animales por grupo mediante sobredosis de ketamina (Ketalar™, Revetmex, México). Los tres animales restantes de cada grupo recibieron un total de cinco inoculaciones, luego de las cuales (día 6 del estudio) se realizó eutanasia siguiendo igual procedimiento. Durante la necropsia se realizó observación macroscópica de todos los órganos y se tomaron muestras de la región anterior, media y posterior de la mucosa nasal, del encéfalo y pulmones, las cuales fueron procesadas siguiendo el método ácido fórmico-citrato de sodio [19] y observadas en un microscopio simple Carl Zeiss con aumentos 40X y 100X.

Índice de irritación (Ii)

Se determinó aplicando el procedimiento descrito en las normas ISO 10993-10 para el cálculo acumulativo

2. Torres JR, Márquez ML, González-Griego A, Ramírez V, Martínez N, Lecuna V. Comparative efficiency of the intradermal vs. Intramuscular active immunizations against hepatitis B with a recombinant vaccine 1993;47(3):145-49.

3. Juliao O, González A, Ramírez V, Rojas MC, Boschell J, Hernández LS y cols. Estudio de inmunogenicidad para dos vacunas recombinantes contra hepatitis B comparando dos esquemas. *Biomédica* 1991;11(1-4):71-83.

4. Hoyos AB, Ramírez V, González A, Trujillo C, Juliao O, Prieto P. Hepatitis B: Inmunogenicidad de la Vacuna recombinante cubana anti-HBV en trabajadores de la salud vacunados sin seroprotección. *Biomédica* 1991;11(1-4):61-4.

5. Pavlova LI, Naskova AV, Ikoev VN, Gorbunov NA, Bekimirov TA. Clinical trials with the Cuban recombinant anti-hepatitis B vaccine. *Biotecnología Aplicada* 1993;10(2):98-9.

6. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR. In: *Mucosal immunology*. (Clark W Ed, 2nd ed). Academic Press, San Diego 1999: 157-70.

7. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 2003; 21(2):S89-S95.

8. Bergquist Ch, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Imm* 1997;65:2676.

9. Stahl SJ, Murray K. Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1989; 86:6283-7.

10. Schodel F, Moriarty AM, Peterson DL, Zheng JA, Hughes JL, Will H y cols. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol* 1992;66: 106-14.

11. Yoshikawa A, Tanaka T, Hoshi Y, Kato N, Tachibana K, Iizuka H y cols. Chimeric hepatitis B virus core particles with parts or copies of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1993;67:6064-70.

12. Borisova GP, Berzins I, Pushko PM, Pumpen P, Gren EJ, Tsibinogin VV, y cols. Recombinant core particles of hepatitis B virus exposing foreign antigenic determinants on their surface. *FEBS Lett* 1989; 259:121-4.

13. Brown AL, Francis MJ, Hastings GZ, Parry NR, Barnett PV, Rowlands DJ, Clarke BE. Foreign epitopes in immunodominant regions of hepatitis B core particles are highly immunogenic and conformationally restricted. *Vaccine* 1991;9:595-601.

14. Jegerlehner A, Tissot A, Lechner FP, Sebbel I, Erdmann T, Kundig y cols. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* 2002;20:25-6.

del índice de irritación [18]. Los indicadores analizados (apariciencia del epitelio, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema) recibieron un valor en función de su intensidad (Tabla 1), registrada durante la evaluación histológica de las muestras procedentes de cada animal, en ambos tiempos de sacrificio (24 horas y día 6 del estudio).

El número asignado a cada indicador por animal fue promediado para obtener un valor por grupo de dosis

$$\frac{\sum Vg}{Z \times n} - \frac{\sum Vc}{Z \times n}$$

(Vg) y a partir de esto, se calculó el Ii según la siguiente fórmula:

donde:

Vg : Valor promedio asignado a cada indicador en el grupo de tratamiento

Z: Número de indicadores (4)

n: Número de animales (3 en cada sacrificio)

Vc: Valor promedio asignado a cada indicador en el grupo control (no tratado)

El índice de irritación obtenido para cada grupo en ambos tiempos de sacrificio fue comparado con los valores de la tabla de clasificación (Tabla 2).

Procesamiento de datos

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo diario de alimentos (CA) y los hallazgos histopatológicos (HH). En todos los casos se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos).

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 8.0 sobre Windows [21]. Para los análisis de PC y CA se verificaron los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) en cada tiempo de evaluación y para cada sexo, aplicándose análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis); en este último caso se realizó la corrección de ajuste de Bonferrony [22]. Se realizaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos, utilizando la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon, en función del cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal. Los datos resultantes del estudio histopatológico fueron analizados a través de la construcción de las tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher). Se realizó el análisis, además, de la relación entre el peso corporal y el consumo de alimento, a través del ajuste de un modelo de regresión lineal.

Resultados

Observaciones clínicas

En las observaciones realizadas diariamente, no se evidenciaron signos de toxicidad local en ninguno de los animales en estudio. No se reportaron cambios en la piel ni en el pelo, en los ojos y membranas mucosas. Los animales mantuvieron una adecuada actividad somatomotora y el comportamiento y

Tabla 1. Valor asignado a cada indicador evaluado en función de su intensidad

Indicadores	Valor asignado				
	0	1	2	3	4
Apariciencia del epitelio	Normal/intacto	Degeneración celular	Metaplasia	Erosión focal	Erosión generalizada
Infiltración leucocitaria	Ausente	Mínima (menor de 25)*	Media (entre 26-50)*	Moderada (entre 51-100)*	Marcada (más de 100)*
Congestión vascular	Ausente	Mínima	Media	Moderada	Severa
Edema	Ausente	Mínimo	Medio	Moderado	Marcado

*células por campo

Tabla 2. Clasificación de la sustancia de ensayo según el índice de irritación

Valor del Ii	Grado de Irritación
0	Sustancia no irritante
1-4	Irritación mínima
5-8	Irritación media
9-11	Irritación moderada
12-16	Irritación severa

respuesta ante estímulos fue normal para la especie. No se observaron estornudos ni movimientos de rascado. Del sitio de administración fue descartada la presencia de signos como edema, eritema, rinorrea, decamaciones, prurito, cambio de coloración y pústulas. No se reportaron muertes.

Comportamiento del peso corporal

A las 24 horas de comenzado el estudio se evidenció pérdida de peso promedio en los animales de todos los grupos, incluido el grupo I (no tratado), no existiendo diferencias significativas entre estos (p=0.135). El día 6 del estudio, después de cinco administraciones, se observó que los animales de los grupos no tratado (I) y administrado con la dosis terapéutica (II) mantuvieron la disminución de peso, mientras que aquellos pertenecientes a los grupos inoculados con las mayores dosis aumentaron su peso promedio (Tabla 3). Estadísticamente, sin embargo, tampoco se evidenció significación entre estos valores (p=0.075).

Se ajustó un modelo de regresión lineal para establecer una posible relación entre la disminución de peso observada y el consumo de alimento, y se determinó que no existió relación significativa entre ambos parámetros, lo que implica que aún cuando los animales en general perdieron peso durante el estudio, mantuvieron un consumo de alimento normal, acorde a lo establecido para el sexo y la especie empleada.

Consumo de alimento

El consumo de alimentos reportó valores similares entre los grupos para cada día de evaluación, sin que

Tabla 3. Variaciones en el promedio de peso corporal

Grupos	PC (g) ± DS		
	Día 0	24 horas	Día 6 del estudio
I	208.2±2.32	206±7.94	194±6.08
II	186.3±2.5	184±0.58	182.7±5.69
III	198.8±5.64	194.7±5.03	198.3±5.03
IV	192.2±7.57	190.3±5.03	199.0±10.39
V	194.7±2.42	190.0±13.23	198.7±9.07

15. Lobaina Y, Garcia D, Abreu N, Muzio V, Aguilar JC. Mucosal immunogenicity of the hepatitis B core antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(3):745-50.

16. Riedl P, Buschle M, Reimann J, Schirmbeck R. Binding immune-stimulating immunonucleotides to cationic peptides from viral core antigen enhances their potency as adjuvants. *Eur J Immunol* 2002;32:1709-16.

17. Rodríguez A. Análisis de calidad del candidato vacunal anti-hepatitis B HBsAg-HBcAg. Informe Final (La Habana). Departamento de Aseguramiento de la Calidad. Dirección de Calidad, CIGB 2002. Informe No. 0556.

18. ISO/WD 10993-10, Part 10 anex D. Biological evaluation of medical devices, 1998. Part 10: tests for irritation and sensitization.

19. Aleator I. Randomization (computer software). Versión 1.1. Dpto de Automatización 1997. CIGB.

20. MacMagnus JF, Mowry RW. Staining methods, histologic and histochemical. Madrid. Atika SA eds 1968.p.123-5.

21. SPSS Inc. Statistical Package Scientific System (1997). version 8.0, Windows.

22. Hochberg Y. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 1988;75:800-2.

se apreciaran diferencias significativas (Test de Kruskal Wallis, $p > 0.05$) obteniéndose un valor promedio de 17.5 g de alimento consumido diariamente (Figura 1). Las comparaciones pareadas de los datos permitieron determinar que no se detectaron variaciones consecutivas significativas en el consumo diario de alimento en los grupos de tratamiento (Test de Wilcoxon, $p > 0.05$).

Hallazgos macroscópicos

Durante la observación macroscópica no fue reportada ninguna alteración morfológica en los órganos y tejidos inspeccionados durante la necropsia.

Evaluación histológica

En el estudio histopatológico se analizaron muestras de la mucosa nasal (sección anterior, media y posterior), pulmones y encéfalo de los animales sacrificados 24 horas después de la primera administración y el día 6 del estudio. Los hallazgos reportados fueron clasificados según lo descrito en la tabla 1.

En los animales que recibieron una sola administración y fueron sacrificados 24 horas posteriores a ésta se observó, como signo relevante, la presencia de congestión vascular mínima y media, que estuvo presente en la totalidad de los animales, incluidos los no tratados. Se observó además infiltración de linfocitos mínima, reportada en algunos animales de los grupos tratados (Figura 2).

En las muestras de encéfalo y pulmones no se detectó ninguna anomalía que pudiera relacionarse con la inoculación del candidato vacunal utilizado.

Después de cinco administraciones, la evaluación histopatológica realizada permitió determinar la presencia de infiltrados linfoides, clasificados como mínimos y medios, así como granulocitos neutrófilos dispersos en dos animales de los grupos IV y V. Se reportó también congestión vascular media, resultados muy similares a los obtenidos en el estudio realizado tras una sola administración (Figura 3).

No se reportaron edemas y la apariencia del epitelio fue normal, sin signos de degeneración celular, metaplasia o erosión. Las muestras de encéfalo y pulmones no arrojaron evidencias de daño atribuible a la sustancia de ensayo.

Al realizar el cálculo del índice de irritabilidad a partir de los valores asignados a cada indicador, según la fórmula anteriormente descrita, se obtuvieron valores inferiores a 1 (Tabla 4), los que al ser comparados con la tabla de clasificación de sustancias (Tabla 2), evidenciaron que la sustancia de ensayo no presentó características irritantes para la mucosa nasal, aun después de ser administrada de forma repetida durante 5 días en dosis de hasta 20 veces la terapéutica.

Discusión

La administración mucosal, específicamente por vía intranasal de productos de origen recombinante ha sido poco explorada desde el punto de vista preclínico. El hecho de que sólo dos capas de células separen el lumen de la cavidad nasal de una vasta red de vasos sanguíneos en la lámina propia hace a la mucosa nasal vulnerable a los efectos adversos de formulaciones administradas por esta vía [23].

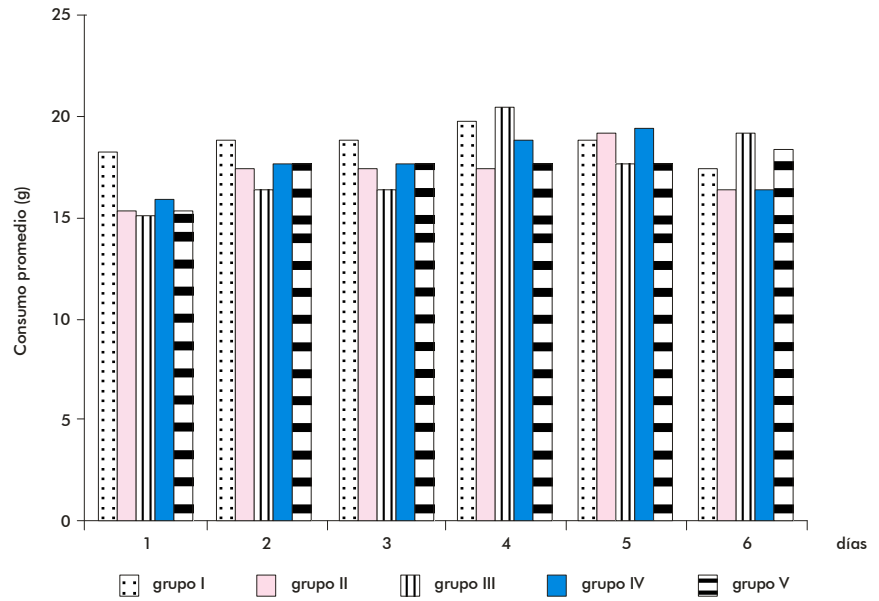


Figura 1. Consumo promedio de alimento (g) durante el estudio.

En nuestro estudio se determinó el potencial irritante del candidato vacunal HBsAg-HBcAg y se exploraron los posibles efectos adversos generados por la administración intranasal de este producto, luego de

23. Martin E, Nicolas GM. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998;29:13-38.

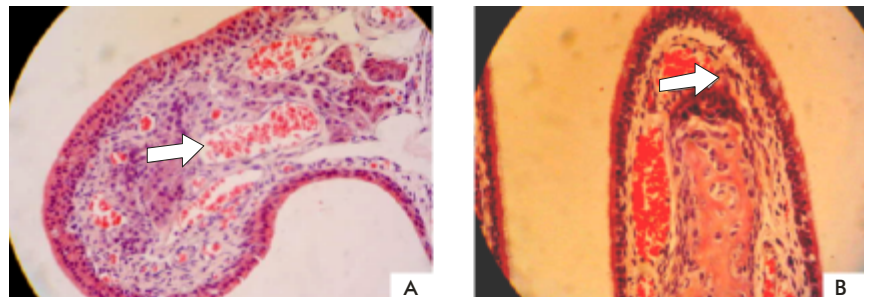


Figura 2. Observación microscópica del sitio de administración de HBsAg-HBcAg después de una inoculación. A: Congestión vascular (flecha) en la lámina propia del epitelio nasal de un animal del grupo control no tratado. B: Infiltración de linfocitos (flecha) en la lámina propia del epitelio nasal de un animal del grupo tratado con la dosis terapéutica (100 X).

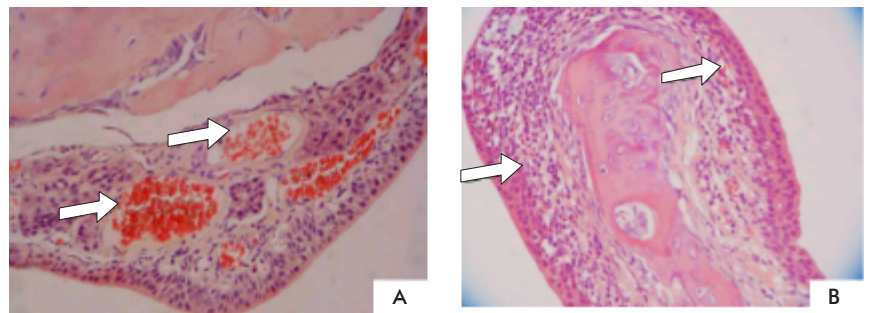


Figura 3. Observación microscópica del sitio de administración de HBsAg-HBcAg, luego de cinco inoculaciones sucesivas. A: Congestión vascular (flecha) de la lámina propia del epitelio nasal de un animal del grupo control no tratado. B: Infiltración de linfocitos y polimorfonucleares (flechas) en la lámina propia del epitelio nasal de un animal tratado con 20 veces la dosis terapéutica (40X).

una única inoculación y tras cinco administraciones sucesivas de dosis hasta 20 veces mayores que la dosis terapéutica, calculada para ratas de 195 g de peso promedio. En las observaciones clínicas realizadas no se evidenciaron alteraciones etológicas ni morfológicas que pudieran ser atribuibles a la sustancia en estudio. El hecho de que los signos típicos de la irritación nasal (estornudos, edemas, rinorrea, prurito) [24, 25] no fueran observados constituye un elemento importante al evaluar la seguridad del producto.

Una observación interesante es el hecho de que los animales, en general, disminuyeron de peso durante el experimento, aún cuando mantuvieron un consumo de alimento dentro del rango establecido para esta especie y sexo, comportamiento observado tanto en los que se sacrificaron 24 horas después de la primera administración como los que se mantuvieron hasta el día 6 del estudio. En nuestro criterio, esta disminución del PC no estuvo relacionada con el producto inoculado, ya que se presentó incluso en el grupo que no recibió tratamiento. En el caso de los animales que recibieron cinco administraciones el PC aumentó ligeramente en los grupos de dosis y disminuyó en el que recibió la inoculación con placebo y en el grupo que no fue administrado, lo cual aporta fortaleza al criterio ya mencionado. El estrés por la manipulación reiterada y las sucesivas administraciones de anestésico fueron, según suponemos, las responsables del comportamiento errático de este parámetro en nuestro estudio, de lo cual hay antecedentes en los reportes realizados por otros autores [26, 27] y coincide con lo referido en la bibliografía especializada [28, 29].

La evaluación histopatológica no arrojó signos que indicaran efectos adversos en la mucosa nasal tras la administración única y reiterada de HBsAg-HBcAg. Los signos más relevantes fueron congestión vascular, resultado de la hiperemia fisiológica normal del epitelio

nasal [30, 31] y la presencia de agregados linfoides difusos en este tejido, sin evidencias de reacción inflamatoria. La lámina propia de la mucosa contiene poblaciones mixtas de linfocitos fundamentalmente T, CD4+ y células B, que exhiben un fenotipo de células activadas como consecuencia de su actividad en la inmunidad mucosal, por lo que la presencia de agregados linfoides reportada en nuestro trabajo forma parte de la anatomía funcional de este tejido [32-34].

Al comparar los valores del Ii calculados (Tabla 4) con la tabla de clasificación (Tabla 2) se evidenció que la sustancia de ensayo no presenta características irritantes para la mucosa nasal, aun después de ser administrada de forma repetida durante 5 días en dosis de hasta 20 veces la terapéutica. En todos los grupos tratados el índice de irritación calculado fue muy bajo (>1), clasificando a esta sustancia como un candidato vacunal no irritante para la mucosa nasal.

Nuestros resultados en esta evaluación evidenciaron que la aplicación reiterada de HBsAg-HBcAg no altera la morfología celular de la mucosa nasal, no causa daños histopatológicos en los órganos estudiados y no produce signos de irritación local, lo que si bien no es concluyente para lograr la aprobación de su empleo en humanos, constituye una importante premisa para evaluar su seguridad antes de realizar estudios clínicos futuros.

Tabla 4. Valor del índice de irritabilidad para cada grupo de tratamiento después de cinco administraciones sucesivas del candidato vacunal HBsAg-HBcAg

Grupo	Índice de irritabilidad
I	-
II	0.08
III	0.25
IV	0.50
V	0.66

24. Tagias A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105,issue 6:599-604.

25. Peebles R, Tagias A. Late-phase reactions in the nose. In: *Allergy and allergic disease*. Kay AB, editor. Maryl 1997. p.269.

26. Flecknell PA. *Laboratory animal anesthesia*. Academic Press, Ontario, Toronto (1978). p.123.

27. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. *Lab Anim Sci* 1987;37:726-30.

28. Kohn DF, Wixson K. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. White WJ and Benson GJ (eds). American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, New York (1997). p. 236.

29. Lumb M, Jones F. En: *Veterinary Anesthesia*. (JC Thurmon, WJ Tranquilli, GJ Benson, eds), Williams and Wilkins, Baltimore 1996.p.189-98.

30. Cauna N, Hinderer KH. Fine structure of blood vessels of the human nasal respiratory mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1969;78:865-85.

31. Dawes JD, Prichard M. Studies of vascular arrangements of nose. *J Anat* 1953;87:311-22.

32. Greaves P, Faccini, JM. *Rat Histopathology*. Elsevier Science Publishers BV. 1984.

33. Tomasi TB. Mechanism of immune regulation at mucosal surfaces. *Rev Infect Dis* 1983;5(suppl. 4):s784-s92.

34. Wolf JL. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med* 1984;35:95-112.

Recibido en mayo de 2004. Aprobado en junio de 2004.