

## Evaluación toxicológica en ratas Sprague-Dawley de Interleuquina-2 y del candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub>, terapia combinada en pacientes con SIDA

Porras\*<sup>1</sup> D, Bacardí<sup>1</sup> D, Aldana L, Merino<sup>2</sup> N, Amaya<sup>1</sup> R, Suárez<sup>1</sup> J, Vázquez A, Valenzuela<sup>1</sup> C, Rojo<sup>1</sup> G, Milá<sup>1</sup> L, Castillo J, Cosme<sup>1</sup> K y Duarte<sup>1</sup> C

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190., Playa, Ciudad de la Habana, CP 10600. Teléfono: 271 6022, 271 6413 ext 2308; Fax: ( 5-37) 33 6008 e-mail: tporras7@hotmail.com; ainf.ep@com.ith.tur.cu.

<sup>2</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos, UH. Departamento de Anatomía Patológica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Calle 222 y Ave. 23. La Coronela. La Habana. Cuba. PO. Box 11600.

Recibido 14 de Febrero de 2003 / Aceptado 12 de Febrero de 2004

**Resumen:** En busca de nuevas fórmulas terapéuticas para combatir la infección por el virus de inmunodeficiencia humana se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, entre las que se encuentran las que estimulan la respuesta de linfocitos T citotóxicos contra antígenos del VIH. A partir de la obtención en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba) de un candidato vacunal que utiliza como vector el virus de la viruela aviar modificado con genes que expresan proteínas anti-VIH, se ha diseñado un estudio clínico que combina la aplicación de este producto (*FPCR*<sub>3</sub>) con la terapia antirretroviral de alta eficiencia y dosis bajas de Interleuquina-2 humana recombinante (IL-2hr). Antes de ensayar estos productos biotecnológicos en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida se hizo necesario realizar pruebas toxicológicas para evaluar su seguridad, para lo cual se diseñaron 2 estudios de toxicidad aguda en los que se evaluó la respuesta sistémica y local de ratas Sprague-Dawley a dosis superiores a la que se administrará en los pacientes incluidos en el estudio clínico piloto. Se utilizaron 50 ratas de la sublínea Cenp: SPRD (Sprague-Dawley) en el estudio de toxicidad aguda de Interleuquina-2hr y 70 animales de esta misma especie y sublínea para el realizado al candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub>. Los productos se administraron por vía subcutánea e intramuscular respectivamente a niveles de 30, 60 y 90 veces la dosis terapéutica. En el estudio realizado al candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub> se incluyeron 3 grupos en los que se realizaron administraciones repetidas, a fin de evaluar de forma preliminar la tolerancia local de este producto. En ambos estudios se incluyó un grupo control inoculado con el placebo de las formulaciones. Se realizó observación clínica diaria y se llevó a cabo el estudio histopatológico de los órganos diana y del sitio de administración. No se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos en los animales inoculados con el candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub> e IL-2. No se reportaron muertes durante los estudios y los animales manifestaron adecuada respuesta ante estímulos, así como incremento progresivo de peso. El estudio histopatológico mostró ligera reacción local caracterizada por secuestro del

inóculo y presencia de tejido de granulación en animales administrados con Interleuquina-2 hr. En los que recibieron diferentes dosis del candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub> se reportaron granulomas macrofágicos de diversa intensidad en el sitio de administración. No se reportó en ningún caso signos de toxicidad en los órganos estudiados. Aún cuando se precisan otros estudios toxicológicos, estos resultados sugieren que la aplicación del candidato vacunal *FPCR*<sub>3</sub> contra el virus de la inmunodeficiencia humana y de Interleuquina-2hr es segura y bien tolerada en el espectro de dosis estudiadas, garantizando un marco de seguridad adecuado para su aplicación en los pacientes infectados con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida incluidos en el estudio clínico piloto.

**Palabras clave:** Toxicidad aguda, vacunas DNA, VIH, Interleuquina-2.

**Abstract: Toxicological evaluation of Interleukin-2 and *FPCR*<sub>3</sub> vaccine candidate in Sprague-Dawley rats, combined therapy in AIDS - patients.** Different types of vaccines have been developed in the search for new therapeutic formulas against the human immunodeficiency virus; among them, are those that stimulate cytotoxic T lymphocyte response against HIV antigens. After a vaccine candidate was obtained at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Havana, Cuba) using a modified fowl pox virus with genes that express HIV proteins, a clinical trial combining the application of this product (*FPCR*<sub>3</sub>) with highly active antiretroviral therapy and low doses of human recombinant Interleukin-2 was designed. Before testing these biotechnological products in patients with acquired immunodeficiency syndrome, it was necessary to evaluate their safety by carrying out various toxicological assays. Two acute toxicity studies were designed in which the systemic and local responses of Sprague-Dawley rats given higher doses than the patients included in the pilot clinical study. Fifty rats of the Cenp subline: SPRD (Sprague-Dawley) were used in the acute toxicity study of hr-Interleukin-2 and 70 animals of this same species and subline were used for the vaccine candidate, *FPCR*<sub>3</sub>. The products were administered by subcutaneous and

\*A quien dirigir la correspondencia.

intramuscular routes respectively, at doses 30, 60 and 90 times higher than the therapeutic dose. Three groups were included in the *FPCR<sub>3</sub>* vaccine candidate study, receiving repeated administrations to evaluate local tolerance for this product. In both studies a control group inoculated with placebo formula, was used. Daily clinical observation was carried out. A histopathological study of the target organs and the administration site was also carried out. No signs of toxicity or adverse effects were observed in the animals inoculated with the *FPCR<sub>3</sub>* vaccine candidate or with IL-2. No deaths were reported during the studies and the animals showed an adequate response to stimuli, as well as a progressive increase in weight. The histopathological study showed a slight, local reaction characterized by the presence of granulation tissue in animals that received Interleukin-2. Macrophage granulomas of different intensities at the administration site were observed in the animals that received different doses of the vaccine candidate, *FPCR<sub>3</sub>*. No signs of toxicity were observed in the target organs. Even though other toxicological studies are necessary, these results suggest that the use of the vaccine candidate, *FPCR<sub>3</sub>* and of Interleukin-2, against the human immunodeficiency virus, is safe and well tolerated when the doses studied are given, assuring adequate safety for its administration to patients infected with the acquired immunodeficiency syndrome included in the pilot clinical trial.

**Keywords:** Acute toxicity, DNA vaccines, VIH, Interleukin-2.

## Introducción

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), caracterizada por la disminución progresiva de células T CD4+ y por el incremento sostenido de la carga viral [1]. El uso de terapias antirretrovirales ha demostrado resultados importantes en la disminución de la replicación del virus, la cual se incrementa rápidamente al cesar la aplicación del medicamento [2]. Estudios comparativos entre pacientes progresivos y no progresivos han demostrado que existe correlación entre una vigorosa respuesta inmune de linfocitos T CD8+ y la disminución de la replicación viral [3], por lo que se ha hecho necesario el uso de estrategias terapéuticas que combinen medicamentos antivirales con estimuladores del sistema inmune, ensayándose diseños que incluyen Interleuquina-2 humana recombinante (IL-2hr), terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE) y vacunas terapéuticas que estimulan la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) [2].

IL-2hr es una citoquina imprescindible para la supervivencia y expansión proliferativa de células T activadas y células "natural killer", por lo que se ha empleado en la terapéutica de pacientes con SIDA, minimizando sus efectos tóxicos mediante la administración de bajas dosis [4].

Por otra parte, las dificultades prácticas en el desarrollo de vacunas contra el VIH que estimulen una respuesta amplia de anticuerpos neutralizantes han centrado la atención en la producción de vacunas terapéuticas que sean capaces de estimular la respuesta de células T citotóxicas contra antígenos de VIH [5], como el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*, obtenido a partir de la trans-

formación de un vector viral de la familia *Poxviridae* (virus de la viruela aviar) con un gen que expresa antígenos anti-VIH.

A partir de la obtención de este producto y de la producción de IL-2hr en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba, se ha diseñado un estudio clínico piloto en el cual se combinará terapia antirretroviral de alta eficacia con administraciones de bajas dosis de IL-2hr y el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*. El objetivo de este trabajo fue realizar estudios de toxicidad aguda de ambos productos biofarmacéuticos y explorar la tolerancia local del candidato vacunal, a fin de evaluar la seguridad de los mismos para su uso en pacientes VIH+.

## Material y Métodos

Los estudios se llevaron a cabo según las normas éticas descritas para el uso de animales de experimentación [6], siguiendo las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio [7, 8] y los Procedimientos Patrones de Operación aprobados para la realización de estudios toxicológicos [9].

### *Animales de ensayo*

Se utilizó la sublínea de ratas Cexp: SPRD *ALY*<sup>®</sup> (Sprague-Dawley) suministrada por la división de roedores gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). A su llegada a la instalación los animales fueron clínicamente examinados, pesados y alojados de forma individual en cajas de makrolón 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 (*ALY co*, *CENPALAB*) fue suministrado diariamente a razón de 25 g por animal y el agua fue suministrada *ad libitum*.

Para el estudio de toxicidad aguda de IL-2 hr fueron seleccionadas 50 ratas, 25 de cada sexo con peso promedio de 166 gramos, (entre 5 y 6 semanas de edad), mientras que para los estudios realizados con el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* se escogieron aleatoriamente 70 ratas, 35 de cada sexo, cuya variación de peso no excedió  $\pm$  el 20 % del valor promedio de 185.5 gramos (edad entre 6 y 7 semanas).

### *Formulación*

Se emplearon formulaciones de IL-2 hr y el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* contra el VIH producidas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba). IL-2hr fue obtenida con un 99 % de pureza (HPLC-RP), actividad biológica de  $5 \times 10^6$  UI/mL y concentración de proteínas (Lowry) de 0.46 mg/mL. Fueron confirmados además, la esterilidad, apirogenicidad, pH y estabilidad de éste producto. La formulación del candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* contra el VIH fue obtenida a partir del virus de la viruela aviar (VVA, familia *Poxviridae*) modificado con un gen que expresa proteínas anti VIH. Fue comprobada su esterilidad, apirogenicidad, estabilidad y título viral ( $1 \times 10^7$  ufp/mL), así como sus propiedades organolépticas, inocuidad y

ausencia de micoplasmas, siendo en todos los casos satisfactorio el resultado de los ensayos realizados [10].

#### *Diseño Experimental*

Los estudios fueron diseñados siguiendo las regulaciones descritas por ICH/EMEA (International Conference on Harmonization/European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) [11, 12]. En el diseño se incluyeron además, aspectos descritos en la guía designada como la 425 de la OECD [13]. Los animales empleados en los estudios de toxicidad aguda de IL-2hr y del candidato vacunal contra el VIH fueron aleatorizados siguiendo una lista generada por el programa *Aleator* [14] y administrados por vía subcutánea e intramuscular respectivamente, siguiendo el esquema siguiente:

#### *Estudio de toxicidad aguda de IL-2hr*

*Grupos experimentales y dosificación:* Se incluyeron en el estudio cinco grupos (cada uno con 10 animales, 5 de cada sexo), en los que se inocularon 3 niveles de dosis, un control administrado con solución salina (0.9%) y otro con el placebo de la formulación.

Grupo I: Control (solución salina 0,9 %)

Grupo II: Placebo

Grupo III:  $1,05 \times 10^6$  UI / kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo IV:  $2,1 \times 10^6$  UI / kg (60 veces la dosis terapéutica)

Grupo V:  $3,2 \times 10^6$  UI / kg (90 veces la dosis terapéutica)

*Frecuencia de administración:* Se realizó administración única el día 1 del estudio, por vía subcutánea (vía que se empleará en el estudio clínico), en el espacio intercostal derecho.

*Duración del ensayo y observaciones:* El estudio tuvo una duración de 14 días, transcurridos los cuales los animales fueron sacrificados. Durante la fase experimental los animales fueron mantenidos en las condiciones ambientales descritas anteriormente y se realizaron observaciones clínicas diarias, a fin de registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad. Estas evaluaciones clínicas se realizaron según el método de valoración descrito por DiPasquale y Hayes [15] e incluyeron cambios en piel y pelaje, coloración y apariencia de las membranas mucosas y ojos, sistema respiratorio, nervioso central y periférico y actividad somatomotora. Se realizó la medición del peso corporal los días 1, 7 y 14 del estudio y se cuantificó el consumo de alimento con una frecuencia diaria.

#### *Estudio de toxicidad aguda y evaluación preliminar de la tolerancia local del candidato vacunal FPCR<sub>3</sub> contra el VIH*

*Grupos experimentales y dosificación:* Los animales se distribuyeron en 7 grupos (cada uno con 10 animales, 5 de cada sexo), que fueron a su vez divididos en función del número de administraciones recibidas. Se incluyeron 2 grupos inoculados con el placebo de la formulación

Grupo I: Placebo

Grupo II:  $4,2 \times 10^5$  ufp/kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo III:  $8,4 \times 10^5$  ufp/kg (60 veces la dosis terapéutica)

Grupo IV:  $12,6 \times 10^5$  ufp/kg (90 veces la dosis terapéutica)

Grupo V: Placebo

Grupo VI:  $4,2 \times 10^5$  ufp/kg (30 veces la dosis terapéutica)

Grupo VII:  $8,4 \times 10^5$  ufp/kg (60 veces la dosis terapéutica)

*Frecuencia de administración:* Los grupos I, II, III y IV recibieron una administración única el día 1 del ensayo por vía intramuscular (vía que se empleará en el estudio clínico), en el cuadriceps femoral de la extremidad posterior derecha. Los grupos V, VI y VII fueron administrados los días 1, 3 y 5, a fin de evaluar de forma preliminar la tolerancia en el sitio de administración tras inoculaciones reiteradas de este novedoso producto, el cual, a diferencia de la IL-2hr no ha sido empleado en esquemas clínicos. Este diseño se realizó siguiendo las regulaciones descritas por ICH/EMEA para estudios de tolerancia local [16].

*Duración del ensayo y observaciones:* Los grupos del I al IV se mantuvieron en estudio durante 14 días, momento en que fueron sacrificados, mientras que los grupos V, VI y VII fueron sacrificados el día 7 del experimento. En ambos casos las condiciones ambientales y los parámetros de observación coinciden con los descritos para el estudio de toxicidad aguda de IL-2hr.

*Estudio histopatológico para ambos estudios:* El día señalado para el sacrificio, a los animales se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical previo tratamiento anestésico con éter y fueron desangrados por un corte en la arteria femoral. Se procedió a la observación de la superficie corporal y cavidades y a la necropsia en la que se realizó la búsqueda macroscópica de signos de toxicidad o anomalías en todos los órganos. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ganglios mesentéricos y sitio de administración, las cuales fueron procesadas utilizando una tinción de hematoxilina-eosina y observadas utilizando un microscopio Carl Zeiss.

#### *Procesamiento de datos*

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo promedio semanal 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).

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), dependiendo del cumplimiento de los supuestos de distribución. 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)[17]. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SSPS 8.0 sobre Windows[18].

**Resultados**

*Observaciones clínicas*

En las observaciones clínicas realizadas diariamente a los animales administrados con IL-2hr y con el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* contra el VIH no se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos. No se reportaron cambios en el pelaje, la coloración, apariencia de ojos y membranas mucosas fue normal, así como la actividad somatomotora y comportamiento, observándose adecuada respuesta ante los estímulos. No se registraron muertes. En el estudio de toxicidad aguda de IL-2hr se observaron quistes pequeños en aproximadamente el 50 % de los animales de los grupos tratados con este producto, así como ligeras induraciones, ambos en el sitio de administración. Estos hallazgos no se relacionan con la dosis estudiada ya que se reportaron con mayor frecuencia de aparición en animales tratados con la menor dosis de IL-2 (6 animales /10), en contraste con un solo animal reportado en el grupo tratado con 90 veces la dosis terapéutica. En los estudios realizados al candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*, las induraciones ligeras en el sitio de inoculación fueron también el único signo registrado, las cuales fueron detectadas solamente en los grupos que recibieron el producto de forma repetida. Este signo manifestó una rápida reversión, siendo indetectable 48 horas después de ser administrada la sustancia de ensayo.

*Peso corporal y consumo de alimento*

En los estudios realizados con ambas sustancias de ensayo (IL-2hr y candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* contra el VIH) se mantuvo un incremento significativo de peso corporal en ambos sexos ( $p=0.0003$ ) (tabla 1, tabla 2), sin que existiera diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en cada tiempo de evaluación ( $p > 0.05$ ).

El consumo de alimento mantuvo un comportamiento similar en ambos estudios realizados. Los animales hembras mantuvieron un consumo promedio entre 19 y 21 gramos /día, mientras que los animales machos consumieron de manera uniforme 25 gramos/día (tabla 3) No se reportaron diferencias significativas entre los grupos de tratamientos ni entre los tiempos de evaluación en ninguno de los casos analizados ( $p > 0.05$ ).

*Hallazgos macroscópicos*

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

*Estudio histopatológico*

*Toxicidad aguda de IL-2 hr*

En el 78 % de los animales involucrados en este estudio no se detectó alteración histológica en el sitio de administración de la sustancia de ensayo. Valores similares se reportaron durante el análisis realizado a muestras de hígado, bazo y ganglios mesentéricos (96 %, 80 % y 100 % respectivamente).

En la tabla 4 se presenta la frecuencia de aparición de los hallazgos en los órganos blanco, siendo evidente que la hematopoyesis extramedular del bazo es el evento más común (18 % de los animales). No fueron encontradas diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores reportados en los grupos control (solución salina y placebo) y los grupos administrados con IL-2 hr, lo que permite asumir que es un hallazgo no relacionado con el producto en estudio. No se observó agotamiento celular en la pulpa blanca del bazo, ni en ganglios mesentéricos, ni ningún otro signo histopatológico que indicara inmunosupresión. En el

**Tabla 1.** *IL-2 hr: Variaciones en el promedio de peso corporal (g). (Media ± Desviación Estándar).*

Grupo	Día 1		Día 7		Día 14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
I	154.0 ± 3.32	176.6 ± 6.66	182.8 ± 11.14	243.0 ± 7.75	196.0 ± 13.47	273.0 ± 9.57
II	158.4 ± 1.82	176.4 ± 7.40	184.8 ± 8.07	239.0 ± 6.78	195.8 ± 10.26	268.6 ± 7.09
III	156.0 ± 5.00	177.0 ± 8.34	188.0 ± 10.02	236.2 ± 8.76	199.8 ± 17.68	262.2 ± 14.04
IV	155.6 ± 3.44	179.4 ± 6.62	186.8 ± 9.52	238.4 ± 5.27	195.6 ± 13.22	266.0 ± 7.18
V	155.4 ± 5.50	179.6 ± 6.80	189.2 ± 11.52	244.6 ± 5.03	203.6 ± 12.70	273.4 ± 8.50

**Tabla 2.** *Candidato vacunal FPCR3 contra el VIH: Variaciones en el promedio de peso corporal (g). (Media ± Desviación Estándar).*

Grupo	Día 1		Día 7		Día 14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
I	176.8 ± 7.9	196.4 ± 11.1	203.0 ± 11.0	245.8 ± 16.5	215.2 ± 13.5	285.2 ± 18.3
II	166.0 ± 12.6	204.8 ± 13.3	192.4 ± 17.1	256.2 ± 11.9	204.6 ± 16.1	290.0 ± 13.0
III	170.6 ± 8.3	208.8 ± 2.9	196.00 ± 8.2	260.2 ± 11.4	207.6 ± 9.0	294.8 ± 9.8
IV	169.8 ± 5.9	207.0 ± 6.5	194.60 ± 5.6	258.2 ± 9.2	208.2 ± 9.2	290.4 ± 8.5
V	170.6 ± 11.7	206.4 ± 11.1	204.0 ± 14.7	258.6 ± 8.7	—	—
VI	166.4 ± 6.1	204.0 ± 10.0	193.67 ± 1.5	247.7 ± 16.0	—	—
VII	165.8 ± 7.9	201.4 ± 19.3	194.00 ± 5.2	262.3 ± 3.5	—	—

**Tabla 3.** Consumo promedio de alimento (g) de animales hembras y machos en ambos estudios. (Media  $\pm$  Desviación Estándar)

Grupo	Sexo	CONSUMO DE ALIMENTO (g)			
		Toxicidad aguda de IL-2hr		Toxicidad aguda y Tolerancia local de FPCR <sub>3</sub>	
		Semana 1	Semana 2	Semana 1	Semana 2
I	V	20.1 $\pm$ 2.0	22.0 $\pm$ 0.8	19.5 $\pm$ 1.4	20.5 $\pm$ 0.7
	H	25.0 $\pm$ 0.0	24.9 $\pm$ 0.1	25.0 $\pm$ 0,0	25.0 $\pm$ 0,0
II	V	20.0 $\pm$ 1.1	24 .0 $\pm$ 0.7	20.5 $\pm$ 1.2	20.4 $\pm$ 1.0
	H	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0,0
III	V	20.6 $\pm$ 0.8	20.7 $\pm$ 1.5	20.0 $\pm$ 0.7	20.0 $\pm$ 1.3
	H	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0,0
IV	V	19.3 $\pm$ 1.1	20.0 $\pm$ 0.7	20.3 $\pm$ 1.2	21.1 $\pm$ 0.9
	H	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0,0
V	V	20.3 $\pm$ 0.7	21.1 $\pm$ 0.2	21.4 $\pm$ 1.0	–
	H	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 0.0	–
VI	V	–	–	19.7 $\pm$ 0.5	–
	H	–	–	25.0 $\pm$ 0.0	–
VII	V	–	–	19.7 $\pm$ 0.8	–
	H	–	–	25.0 $\pm$ 0.0	–

**Tabla 4.** Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos en el estudio de Toxicidad aguda de IL-2hr.

Grupo	Sitio de administración				Hígado		Bazo		Ganglio
	NAS	S	TG	ED	NAS	HE	NAS	HE	NAS
I	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	5/10	5/10	10/10
II	9/10	0/10	0/10	1/10	9/10	1/10	9/10	1/10	10/10
III	8/10	2/10	1/10	0/10	9/10	1/10	9/10	1/10	10/10
IV	7/10	3/10	0/10	0/10	10/10	0/10	9/10	1/10	10/10
V	5/10	3/10	2/10	0/10	10/10	0/10	8/10	2/10	10/10

NAS Nada a señalar, S secuestro del inóculo rodeado por reacción granulomatosa, TG Tejido de granulación, ED Edema de la dermis, HE Hematopoyesis extramedular.

sitio de administración, el 16 % de los animales, pertenecientes a los grupos inoculados con IL-2 hr, presentaron secuestro del inóculo rodeado de reacción granulomatosa, sin que la comparación de estos valores con los grupos control y placebo mostraran significación estadística ( $p > 0.05$ ). Se observó además tejido de granulación subcutánea (Figura 1).

#### *Toxicidad aguda y tolerancia local del candidato vacunal FPCR<sub>3</sub> contra el VIH*

En el 65 % del total de animales estudiados, no se reportaron hallazgos histopatológicos en el sitio de administración, siendo en el resto la reacción granulomatosa de diferentes tipos el principal signo encontrado. Esta reacción está compuesta mayormente por macrófagos y fue localizada preferentemente en el endomisio de las fibras musculares, acompañada de tejido de granulación incipiente y de eventual regeneración del sarcolema (Figura 2). Fue reportada además hematopoyesis en hígado y bazo (Figura 3), sin que existieran diferencias significativas entre la frecuencia de aparición en los grupos tratados con la sustancia de ensayo y el grupo placebo ( $p > 0.05$ ) (tabla 5)

#### **Discusión**

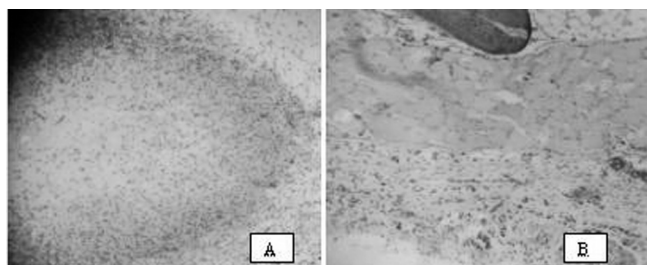
El incremento sostenido de peso y el consumo estable de alimento mantenido por los animales utilizados en los estudios pre-clínicos de seguridad realizados a IL-2 hr y al candidato vacunal FPCR<sub>3</sub> constituyen índices indirectos de la no toxicidad de las sustancias estudiadas, dada la sensibilidad de estos parámetros para detectar alteraciones debidas a sustancias exógenas, incluso aquellas de baja toxicidad. Independientemente de la dosis administrada, los animales aumentaron de peso durante la fase experimental de los estudios de forma significativa ( $p < 0.05$ ) hasta el momento del sacrificio, sin que aparecieran variables en cada tiempo de evaluación que indicaran la influencia de dosis de hasta 90 veces la dosis terapéutica en ambos parámetros, que registraron valores similares a los reportados para animales sanos de la especie [19,20].

Nuestras observaciones clínicas conducen a confirmar la seguridad de estos productos; no se evidenciaron alteraciones etológicas ni morfológicas que pudieran ser atribuibles a las sustancias en estudio. Las induraciones encontradas de forma poco frecuente y reversible en el caso de animales tratados con tres

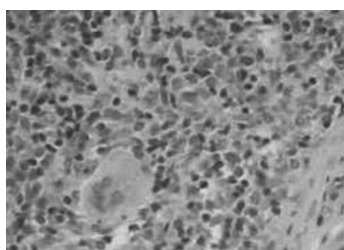
**Tabla 5.** Toxicidad aguda del candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* contra el VIH. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas por grupos.

Grupo	Sitio de administración						Hígado		Bazo		Timo	Ganglio
	NAS	GFM	GD	GFM	GFMD	TG	NAS	HE	NAS	HE	NAS	NAS
I	9/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	4/10	6/10	0/10	0/10
II	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10	2/10	4/10	6/10	0/10	0/10
III	9/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	10/10	0/10	4/10	6/10	0/10	0/10
IV	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	9/10	1/10	5/10	5/10	0/10	0/10
V	6/10	1/10	0/10	2/10	1/10	0/10	7/10	3/10	4/10	6/10	0/10	0/10
VI	1/10	0/10	1/10	3/10	4/10	1/10	8/10	2/10	5/10	5/10	0/10	0/10
VII	0/10	0/10	1/10	4/10	5/10	0/10	7/10	3/10	1/10	9/10	0/10	0/10

Leyenda: GD: Granuloma difuso, GFM: Granuloma focal minino, GFMD: Granuloma focal minimo disperso, TG: Tejido de granulación, HE Hematopoyesis extramedula, H: Hígado, B: Bazo, T: Timo, GL: Ganglios linfáticos, NAS: Nada a señalar.



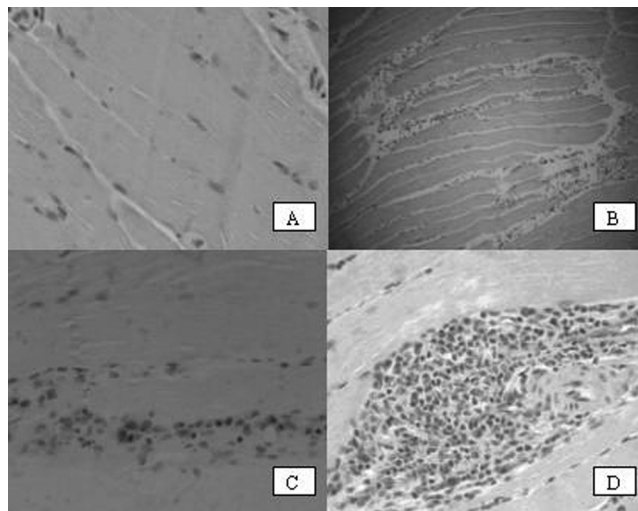
**Fig. 1.** Observaciones microscópicas en el sitio de administración de IL-2hr. A. Secuestro de inóculo. B Tejido de granulación subcutáneo.



**Fig. 3.** Hematopoyesis extramedular en bazo de un animal inoculado con el grupo placebo en el estudio de Toxicidad aguda del candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*.

dosis del candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*, así como los pequeños quistes observados en los animales administrados con IL-2 hr no parecen tener relación con las dosis administradas, sino con el mecanismo de acción de éstos producto, según han reportado otros autores [21, 22, 23, 24] y no constituyen efectos adversos de consideración, dada su baja frecuencia de aparición y su mínima intensidad.

La observación microscópica realizada durante el estudio histopatológico confirma el resultado de las observaciones clínicas reportadas. En el sitio de administración la mayoría de los animales no mostraron ningún signo de alteración histológica. La IL-2hr utilizada en bajas dosis desarrolla reacciones de tipo inflamatoria como consecuencia de la activación de la cascada de citoquinas proinflamatorias (interferón g, factor estimulador de colonias de macrófagos, entre otras) y de la proliferación y diferenciación de macrófagos y células linfoides [21], lo que condiciona la formación de granulomas macrofágicos de diver-



**Fig. 2.** Observaciones microscópicas en el sitio de administración en animales inoculados con el candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>*. A- fibra muscular sin alteraciones. B- granuloma mínimo disperso. C- granuloma focal mínimo. D-granuloma macrofágico con tejido de granulación incipiente.

sa intensidad Otros autores [22] han reportado la presencia de eosinófilos y leucocitos mononucleares (entre los días 4 y 7 del estudio) en el sitio de administración en ratones inoculados con dosis bajas de IL 2 hr, la cual se tradujo en inflamación en la región donde fue administrado el producto. Los efectos encontrados por nosotros son de menor severidad que los reportados en la literatura.

Los distintos tipos de reacción granulomatosa observados en los animales tratados con dosis de hasta 90 veces la dosis terapéutica del candidato vacunal *FPCR<sub>3</sub>* son la respuesta esperada ante la inoculación de una sustancia inmunogénica y ha sido reportada por autores que han empleado vacunas similares a ésta en adultos seronegativos [23]. Por su magnitud se consideran efectos poco significativos a nivel local

La hematopoyesis extramedular, (fundamentalmente en el bazo, y en menor frecuencia en el hígado), se ha descrito con anterioridad como resultado de la respuesta orgánica a la influencia moderada de estrés en el curso de la experiencia [24]. La frecuencia de aparición de este signo en el bazo es mayor en el grupo administrado con solución

salina que en los grupos tratados con IL-2 hr, mientras que en el hígado solo aparece en 2 animales, uno de los cuales fue inoculado con el placebo de la formulación. En el caso de los animales tratados con el candidato vacunal, la frecuencia con que se reportó hematopoyesis extramedular de bazo es similar entre todos los grupos en estudio, lo que permite asumir la independencia de este hallazgo del producto inoculado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede afirmar que la IL -2 hr aplicada en los niveles de dosis estudiados no evidencia alteraciones, ni locales ni sistémicas, que puedan ser interpretadas como signos de toxicidad o daño biológico, lo que confirma los resultados obtenidos por Kendall [2] en estudios clínicos cuya estrategia terapéutica combina el uso de productos antirretrovirales y vacunas anti VIH con el uso de bajas dosis de este producto (  $2,5 \times 10^6$  UI/ día) a fin de minimizar los efectos tóxicos derivados del mecanismo de acción de esta citoquina y propiciar la recuperación acelerada de los niveles de inmunidad en pacientes con SIDA. El candidato vacunal ensayado (FPCR<sub>3</sub>) no evidenció tampoco efectos adversos ni en el sitio de administración, ni en los órganos diana estudiados, lo cual sugiere que, aun cuando se precisen otros estudios toxicológicos, ambos productos biofarmacéuticos podrían ser empleados con un adecuado marco de seguridad en un estudio clínico piloto de terapias combinadas en pacientes VIH+.

## Referencias

- Walker B. (1999) Cellular immune response in VIH-1 infections and effects of therapy on immunologic parameters. *Int AIDS Soc*, 74-8.
- Smith K. (2001). Low dose daily Interleukin- 2 immunotherapy: accelerating immuno restoring and expanding VIH-specific T-cell immunity without toxicity. *AIDS* 15: S28- S35.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, *et al.* (1997). Vigorous VIH-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 278:1447-1450.
- Smith K, Jacobson E. (1999). Restoration of immunity with IL-2 therapy. *The AIDS reader* 9: 563-572.
- Corey L., Mc Elrath J., Weinhold K., Matthews T., Stablein D., Grahm B., *et al.* (1998) Cytotoxic T cell and Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency Virus Type 1 envelope with a combination vaccine regimen. *J. Infectious Dis.* 177:301-9.
- Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals (1998) World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science( ICLAS).
- Food and Drug Administration (1997) Good Laboratory Practice for non clinical laboratory studies. Title 21 Code of Federal Regulations, Subchapter A, Part 58.
- Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. (1998) UBioterio, CIGB.
- Procedimientos Patrones de Operación. UBioterio. CIGB.
- Rodríguez A (2002). Análisis de calidad de IL.2hr y el candidato vacunal FPCR3 contra el VIH. Informe Final. (La Hab). Departamento de Aseguramiento de la Calidad. Dirección de Calidad. CIGB. Informe N° 065/02.
- ICH/EMEA(1997). Preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Step 4.
- ICH/EMEA (2000) No-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (M) (modification of CPMP/ICH/286/95).
- OECD (2001). Guidelines for the Testing of Chemicals 425: Acute Oral Toxicity; Modified Up-and-Down Procedure.. Section 4: Health Effects (Updated Guideline, adopted 20th December 2001).
- Aleator I (1997). Randomization (computer software). Versión 1.1. Dpto de Automatización, CIGB.
- DiPasquale L, Hayes W. (2001). Acute Toxicity and Eye Irritancy. In: Principles and methods of Toxicology. (Hayes W ed., Fourth Edition).pp 864-867. Taylor and Francis, Philadelphia, USA.
- ICH/EMEA (2001) Note for Guidance on Non-Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products, CPMP/SWP/2145/00 (CPMP adopted Feb. 01).
- Hochberg, Y. (1988) A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance *Biometrika* 75: 800-802.
- SPSS Inc.(1997)Statistical Package Scientific System, version 8.0, Windows.
- Charles River France (1992) Technical Information. Rat CD.Crl: CD(SD)BR.
- IFFA CREDO (1991) Laboratory Animals. Technical Information, 'The OFA rat (Sprague/Dawley)
- Smith K. (2000) Interleukin 2 immunostimulation. *Therapeutic Immunology*. 2<sup>a</sup> edition (K. Austen, S. Brakoff, F. Rosen, Eds). Blackwell Sci, Cambridge, MA.
- Dunn C.J, Hardee M.M *et al* (1996) The inflammatory potential of IL-2: local induction of a specific chronic granulomatous lesion in mice.
- Clements-Mann ML., Weinhold K., Matthews TJ., Graham BS., Gorse GJ., Keefer MC., McElrath J., *et al.* (1998) Immune responses to human immunodeficiency virus type 1 induced by canarypox expressing VIH-IMN gp120, VIH-1 SF2 recombinant gp120 or both vaccines in seronegative adults. *J. Infectious Dis*, 177\_ 1230-1246
- Swan, CJV (1973) Tumours of the haematopoietic System. In: V.S.Turosov (Ed.). *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol 1, pp 185 -214. Iarc Scientif Pub. N° 5, Lyon.