

Estudio piloto de toxicidad e inmunogenicidad del candidato vacunal SOBERANA 01 contra el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo en ratas Sprague Dawley

Mildrey Fariñas-Medina^{1*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6530-9904>
Tamara Hernández-Salazar^{1**} ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4311-2881>
Reynaldo Oliva-Hernández¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8198-9161>
Sandra Rodríguez-Salgueiro² ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3341-128X>
Juan Francisco Infante-Bourzac¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6369-8608>
Darcy Núñez-Martínez¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8157-9884>
Ambar Oyarzabal-Vera² ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3014-5457>
Yisabel Arranguren-Masorra¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1758-938X>
Laura Marta Rodríguez-Noda¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0171-4681>
Yanet Climent-Ruiz¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2824-6374>
Dagmar García-Rivero¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2099-1791>

¹ Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

² Centro de Productos Naturales (CPN), Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

Corresponding author: mfarinas@finlay.edu.cu

En el Instituto Finlay de Vacunas se desarrolló el candidato vacunal SOBERANA 01 contra el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo, que contiene el dominio de unión al receptor en su forma dimérica, vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B e hidróxido de aluminio como adyuvante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad del candidato vacunal SOBERANA 01 contra el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo mediante un estudio piloto de toxicidad a dosis repetidas e inmunogenicidad en ratas Sprague Dawley. Se utilizaron 45 ratas Sprague Dawley macho (250-300 g), divididas en tres grupos: control, placebo (excipientes) y candidato vacunal, en donde las sustancias se administraron por vía intramuscular por 4 días. Durante el estudio se evaluó el estado fisiológico, dolor, peso corporal, consumo de agua y alimentos, valores de temperatura corporal y del sitio de inoculación, diámetro muscular e irritación local. Los días 3, 7 y 14 post-inoculación se determinaron los parámetros de bioquímica sanguínea, hemoglobina, evaluación inmunológica, estudios anatomopatológicos y peso de órganos. No se reportaron muertes, ni hubo diferencias entre los grupos asociadas a la sustancia de ensayo en cuanto a peso corporal, temperatura corporal y del sitio de inoculación, diámetro muscular, irritabilidad dérmica, parámetros de bioquímica sanguínea, hemoglobina, ni se observaron alteraciones anatomopatológicas de valor diagnóstico. Además, SOBERANA 01 indujo títulos altos de IgG contra el dominio de unión al receptor. En conclusión, el candidato vacunal SOBERANA 01 contra el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo resultó inmunogénico, no evidenció efectos adversos tóxicos y fue bien tolerado por vía intramuscular en las ratas Sprague Dawley, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

Palabras clave: vacunas SARS-CoV-2; toxicidad; inmunogenicidad vacunal; ratas Sprague Dawley.

* MSc, Médico Veterinario Zootecnista, Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

** MSc, Licenciada en Medicina Veterinaria, Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

Introducción

El Instituto Finlay de Vacunas (IFV), centro dedicado a la investigación, desarrollo y producción de vacunas, desarrolló tres candidatos vacunales contra el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) causante de la enfermedad COVID-19. Uno de los componentes clave en este desarrollo es el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) de la proteína S del virus, considerado un antígeno vacunal de alta relevancia. El fragmento seleccionado del RBD contiene la región de la proteína S que interactúa directamente con el receptor ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2, por sus siglas en inglés), lo que facilita la entrada del virus a las células del huésped. Se ha demostrado que el RBD es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes generados durante la respuesta inmune frente al virus, lo que subraya su importancia como diana antigénica en la formulación de vacunas efectivas.^(1,2)

SOBERANA 01 consiste, básicamente, en una combinación de la forma dimérica del RBD como antígeno específico con la vesícula de membrana externa (VME) de *N. meningitidis* serogrupo B. Las VME han demostrado ser un potente activador de la respuesta inmune gracias a la presencia en su estructura de varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: del inglés “pathogen associated molecular patterns”), como el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membranas. Estos elementos son reconocidos rápidamente por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR: del inglés “pattern recognition receptors”) expresados en células del sistema inmunitario innato, tales como los receptores tipo Toll (TLRs), especialmente TLR4, lo que desencadena una cascada de señales que activan la respuesta inflamatoria y promueven la maduración y migración de las células presentadoras de antígenos, como las dendríticas. Esta activación potencia la producción de citocinas proinflamatorias y favorece un entorno inmunológico propicio para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa eficaz. Por tanto, las VME no solo actúan como vehículos antigénicos, sino también como potentes inmunoadyuvantes que potencian la respuesta inicial del organismo frente a infecciones.⁽³⁾

Las investigaciones preclínicas en modelos animales han sido ampliamente utilizadas en los estudios de inmunogenicidad y seguridad de diferentes vacunas en aras de permitir su evaluación segura en la fase clínica.⁽⁴⁾ En este contexto, los estudios piloto de toxicidad constituyen investigaciones preliminares críticas diseñadas para obtener datos tempranos de seguridad e inmunogenicidad, orientar la selección de dosis y optimizar el diseño de los estudios definitivos conforme a

Buenas Prácticas de Laboratorio.⁽⁵⁾ Diversos candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 han sido sometidos a evaluaciones preclínicas similares en modelos de roedores, lo que demuestra la utilidad de este enfoque.^(6,7)

El objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01 mediante un estudio piloto de toxicidad a dosis repetidas e inmunogenicidad en ratas Sprague Dawley.

Materiales y Métodos

Candidato vacunal a evaluar

El candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 de subunidad proteica SOBERANA 01 emplea la tecnología de ADN recombinante para la expresión de la molécula RBD, en la línea celular CHO K1, que comprende desde los residuos Arg 319 hasta Phe 541 con 6 residuos adicionales de His en su extremo C terminal para facilitar el proceso de purificación. Esta región contiene, además, cuatro enlaces disulfuro intramoleculares y cuatro sitios de glicosilación (2 N y 2 O). Esta secuencia aminoacídica tiene la peculiaridad de tener una cisteína libre en la posición 538, que permite la formación estable de dímeros de RBD. La formulación contiene, además, VME de *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciador de la respuesta inmune e hidróxido de aluminio como adyuvante.⁽³⁾ La producción se realizó en el IFV y el Centro de Inmunología Molecular (CIM) de La Habana, Cuba, según las Buenas Prácticas de Fabricación.

Animales y manejo

Se utilizaron ratas Sprague Dawley (SD) macho con 8-9 semanas de edad (250-300 g) suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Las instalaciones donde se alojaron los animales mantuvieron una temperatura de 21 ± 2 °C y una humedad relativa de 55 ± 5 %, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h oscuridad. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Las ratas se alojaron en cajas T4, a razón de 5 animales por caja y se aclimataron durante una semana antes de comenzar el diseño experimental. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IFV (Código: P-01/21).

Diseño Experimental

El estudio siguió las recomendaciones y directrices emitidas para la evaluación de vacunas.^(8,9) Se utilizaron ratas de un solo sexo teniendo en cuenta que se trata de un estudio piloto. Un total de 45 ratas SD macho se asignaron aleatoriamente a tres grupos experimentales (15 por grupo): control (que recibió solución salina fisiológica al 0,9 %, PBS), placebo (que recibió hidróxido de aluminio 625 µg) y candidato vacunal (que recibió cuatro dosis de la formulación de SOBERANA 01, compuesta por RBD 50 µg + VME 10 µg + Al(OH)₃ 625 µg). Las dosis se administraron por vía intramuscular en las extremidades posteriores a nivel del músculo cuádriceps femoral a intervalos de 24 h, alternativamente en extremidades opuestas, durante 4 días, con un volumen de inyección de 0,25 mL, en correspondencia con el máximo permitido para esta vía de administración y especie.⁽⁸⁾ Los días 3, 7 y 14 después de la última inoculación, se realizaron las eutanasias de las ratas (cinco animales por eutanasia por grupo).

La aleatorización de los grupos y sus correspondientes eutanasias se llevó a cabo mediante la generación de números aleatorios mediante el programa Excell. Antes de comenzar los experimentos se comprobó que no había diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos ni entre las eutanasias (Programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows).

Signos clínicos, dolor y peso corporal

Los animales fueron monitoreados después de la primera inyección, cada 12 h durante 7 días y luego diariamente hasta el final del experimento. Se examinó cuidadosamente el sitio de administración y se observó la aparición de alguno de los siguientes signos: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, sacudidas de cabeza, ataxia, salivación, dificultad para respirar, lagrimeo, hiperactividad o letargo, incoordinación, diarrea o cualquier otro signo. También se evaluó la percepción de dolor manifestado por los animales mediante las señales expresadas en la escala de dolor reportada previamente para este fin.⁽¹⁰⁾ Se realizaron pesajes diarios a todos los animales desde el inicio de la administración de los tratamientos, así como en los días de eutanasia.

Consumo de agua y alimento

Estos parámetros fueron evaluados diariamente. El agua se midió con una probeta de 1.000 mL; se depositaron y repusieron cada vez 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja de ratas, el volumen remanente se registró y calculó por diferencia del volumen consumido por el grupo. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, esta diferencia se dividió entre el número de animales de la caja y el número de días transcurridos desde la última medición. De forma similar se realizó la evaluación del consumo de alimento, cada vez que se hizo una medición se completaron en las tolvas de las cajas con 500 g de pienso.

Termometría, temperatura y diámetro muscular en el sitio de inyección

Estos parámetros se midieron el día 0 (antes y después de cada inyección en todos los grupos estudiados), a las 4, 8, 24, 48 y 72 h (en total, durante 144 h). La temperatura corporal y en el sitio de inyección se midió con un termómetro clínico láser (Equate, termómetro frontal sin contacto, modelo n.º10857, Mississauga, ON, Canadá) en el tórax previamente depilado y en la parte interna de ambas extremidades. El diámetro muscular de las extremidades inoculadas se midió en el centro del muslo con un calibrador electrónico con pantalla digital de 150 mm (Mastercraft, Toronto, ON, Canadá), según lo indicado por los fabricantes.

Irritabilidad dérmica

La irritabilidad dérmica en el sitio donde se administraron los tratamientos se evaluó por el método de Draize, en donde se identificó la presencia de eritemas, edemas, escaras o pápulas.⁽¹¹⁾ El índice de irritabilidad dérmica (IID) se calculó mediante la sumatoria de todos los valores determinados durante las observaciones (0, 4, 8, 24, 48 y 72 h después de la última dosis) y dividiéndolos entre el número de observaciones.

Eutanasia y extracción de sangre

Todos los animales fueron sometidos a ayuno de 4 h antes de cada eutanasia mediante una sobredosis intravenosa de tiopental sódico 80 mg/kg de peso

(Laboratorios AICA, La Habana, Cuba). Para la extracción de sangre, las ratas se desangraron según las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio⁽¹²⁾ y las recomendaciones sobre el punto final humanitario.⁽¹³⁾ Las muestras de sangre obtenidas se emplearon para los estudios de bioquímica sanguínea, hemoglobina e inmunología.

Evaluaciones de bioquímica sanguínea y hemoglobina

Se analizaron la hemoglobina y la bioquímica sanguínea, que incluyó determinaciones de glucosa, ácido úrico, creatinina, proteínas totales, triglicéridos, colesterol, mediante estuche diagnóstico (Helfa Diagnostics, CIE, La Habana, Cuba) y un espectrofotómetro (Genesys 10 S, China). Se analizaron simultáneamente una muestra de suero normal y una de control patológico (Helfa Diagnostics) con cada grupo de 10 muestras, según las instrucciones del fabricante.

Evaluación inmunológica

ELISA de IgG anti-RBD

Se recubrieron placas ELISA (96 pocillos, NUNC, Maxisorp) con el antígeno dimérico RBD (50 µL por pocillo, 3 µg/mL en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se bloquearon las placas en PBS-BSA al 5 % durante 1 h a 37 °C. Tras cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0,5 %, se añadieron diluciones seriadas de muestras de suero (1:3, en PBS-BSA al 1 %, pH 7,2) a partir de 1/50. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C y se lavaron con PBS-T. Se añadió anticuerpo de cabra anti-rata IgG-HRP (Sigma Aldrich) diluido 1/5000 en BSA-PBS al 1 %, pH 7,2 y las placas se incubaron durante una h más a 37 °C. Tras cinco lavados con PBS-T, las placas se incubaron durante 20 min tras añadir el sustrato 3',3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas ELISA (Multiskan EX, ThermoScientific). El título final se definió como la dilución recíproca más alta del suero que arrojara una absorbancia > 4 veces superior al valor del suero preinmune diluido 1/50.⁽¹⁴⁾

Estudios anatomopatológicos y peso de órganos

Las observaciones anatomopatológicas macroscópicas se realizaron inmediatamente después de cada eutanasia en los días 3, 7 y 14. Se pesaron los órganos parenquimatosos: cerebro, timo, corazón, pulmones, bazo, hígado, riñones, glándulas adrenales, ganglios inguinales profundos (GIP) y poplíteos (GP). Se calculó el peso relativo de órganos (PRO) mediante la fórmula: $PRO = (PO \times 100) / PFE$, donde PO es el peso del órgano y PFE el peso corporal final del animal en el día de la eutanasia.

Se realizó el examen histopatológico de todos los órganos que mostraron alteraciones macroscópicas en la necropsia, los órganos parenquimatosos, así como de muestras de piel, tejido celular subcutáneo y músculo del sitio de inoculación de todos los animales.

Las muestras de bioquímica sanguínea, hematología, histopatología y el peso de órganos se condujeron según las indicaciones de la OMS y la FDA.^(5,15)

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Para los datos que cumplieron los supuestos paramétricos, se aplicó ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Cuando no se cumplieron los supuestos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de Dunn. Para los hallazgos macroscópicos, se empleó la prueba exacta de Fisher para comparar las incidencias entre grupos. Se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0,05$ para todas las comparaciones.

Resultados

Signos clínicos, dolor y peso corporal

Durante el ensayo no se observaron signos clínicos, ni se registraron muertes. El índice de dolor fue 0. Todos los animales incrementaron su peso corporal durante el ensayo, sin diferencias entre los grupos en estudio (Fig. 1).

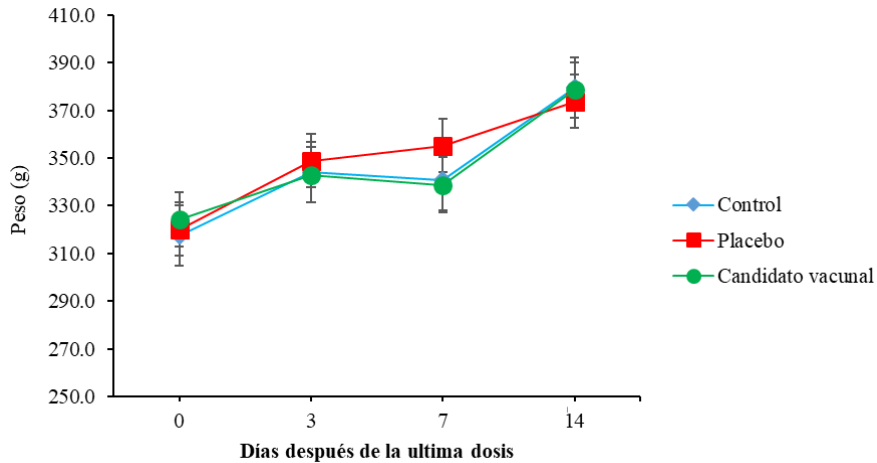


Fig. 1. Comportamiento del peso corporal de ratas Sprague Dawley macho, después de la aplicación de la última dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01. Cada valor representa el promedio por grupo en cada tiempo \pm el error típico. Prueba de comparación múltiple de Bonferroni. $p \geq 0,05$.

Consumo de agua y alimento

El consumo de agua y alimento se comportó de forma similar en los tres grupos experimentales; solo se observaron diferencias entre los grupos placebo y candidato vacunal ($p=0,0450$) en cuanto a consumo de agua durante la primera semana de evaluación, siendo el promedio del grupo placebo superior. Los valores promedios de consumo de agua y alimento son similares a los datos históricos registrados en estudios realizados en las instalaciones del IFV.⁽¹⁶⁾

Termometría, temperatura y diámetro muscular del sitio de inyección

Las temperaturas corporales se mantuvieron dentro del rango fisiológico reportado para la especie durante las evaluaciones realizadas.⁽¹⁷⁾ No obstante, se observaron diferencias a las 24 h ($p= 0,0097$) en el grupo placebo con respecto a los grupos control y candidato vacunal, con una media superior en el placebo; así como a las 96 h ($p= 0,0281$) del grupo candidato vacunal con respecto a control y placebo, con una media superior en el candidato vacunal ($36,75 \pm 0,07229$).

Los promedios de temperatura del sitio de inyección registrados en ambas extremidades posteriores de todos los grupos de tratamientos presentaron diferencias a partir de las 72 h hasta las 144 h de evaluación. En esos tiempos el grupo control presentó un promedio de

temperatura local superior a los grupos placebo y candidato vacunal (Fig. 2), si bien los valores fueron similares a los registrados en la temperatura corporal. Por otra parte, desde el punto de vista individual de los animales por grupos, no se observaron cambios ostensibles de temperatura en el sitio de inyección y los valores estuvieron dentro de los rangos fisiológicos de la especie.⁽¹⁷⁾

La evaluación de la inflamación local asociada al sitio de inyección mediante la medición del diámetro muscular evidenció diferencias significativas al comparar los promedios de ambas extremidades en los animales en todas las evaluaciones. En este sentido, el grupo control presentó promedios inferiores con respecto a los grupos placebo y candidato vacunal; sin diferencias significativas entre estos dos últimos (Fig. 3).

Irritabilidad dérmica

El ensayo de irritabilidad dérmica mostró ausencia de eritemas, edemas, escaras, o pápulas, por lo que el IID para los tres grupos experimentales fue de 0,0.

Evaluaciones bioquímicas y hemoglobina

En los parámetros sanguíneos de los animales solo mostró diferencias la creatinina en la primera eutanasia ($p=0,0079$), donde el promedio del grupo placebo fue superior a los grupos candidato vacunal y control. No obstante, este parámetro se encontraba dentro del rango

Tabla 1. Comportamiento de los parámetros bioquímicos sanguíneos y hemoglobina de ratas Sprague Dawley macho, después de la aplicación de la última dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01.

	Glucosa (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)	Triglicéridos (mmol/L)	PT (g/dL)	AU (μ mol/L)	Creatinina (μ mol/L)	HB -
Primera eutanasia (3 días después de la última dosis)							
Control	8,98 \pm 1,0	1,44 \pm 0,33	1,23 \pm 0,50	5,03 \pm 0,30	78,37 \pm 58,94	59,80 \pm 8,29	12,91 \pm 0,21
Placebo	8,57 \pm 0,98	1,29 \pm 0,41	1,20 \pm 0,26	5,13 \pm 0,19	65,74 \pm 30,45	70,80 \pm 8,04	12,97 \pm 0,42
Candidato vacunal	8,39 \pm 1,13	1,41 \pm 0,29	1,14 \pm 0,28	5,19 \pm 0,51	87,07 \pm 56,58	49,75 \pm 5,19	12,56 \pm 0,36
	p=0,6634	p=0,5434	p=0,9231	p=0,7761	p=0,8583	p=0,0079*	-
Segunda eutanasia (7 días después de la última dosis)							
Control	8,81 \pm 1,68	1,22 \pm 0,09	0,76 \pm 0,09	5,87 \pm 0,34	68,80 \pm 35,31	53,10 \pm 6,31	12,92 \pm 0,34
Placebo	10,75 \pm 2,50	1,23 \pm 0,12	0,84 \pm 0,19	6,00 \pm 0,18	79,93 \pm 30,42	45,91 \pm 3,15	13,17 \pm 0,66
Candidato vacunal	9,72 \pm 1,19	1,27 \pm 0,16	0,76 \pm 0,21	5,73 \pm 0,24	66,05 \pm 41,47	51,99 \pm 7,16	13,50 \pm 1,00
	p=0,2954	p=0,5691	p=0,7229	p=0,3098	p=0,8150	p=0,1505	-
Tercera eutanasia (14 días después de la última dosis)							
Control	9,26 \pm 1,51	1,42 \pm 0,32	0,71 \pm 0,23	5,78 \pm 0,20	98,24 \pm 29,88	54,17 \pm 12,20	9,81 \pm 0,65
Placebo	8,05 \pm 1,07	1,54 \pm 0,38	0,48 \pm 0,12	5,73 \pm 0,24	72,72 \pm 9,73	55,78 \pm 5,16	9,97 \pm 0,43
Candidato vacunal	7,33 \pm 0,90	1,48 \pm 0,25	0,51 \pm 0,18	5,89 \pm 0,31	83,17 \pm 39,50	54,74 \pm 5,23	9,41 \pm 0,84
	p=0,0684	p=0,8537	p=0,1317	p=0,6026	p=0,4073	p=0,9518	-

PT: proteínas totales. AU: ácido úrico. HB: hemoglobina. Cada valor representa el promedio por grupo \pm la desviación estándar. Prueba de ANOVA. * $p \leq 0,05$.

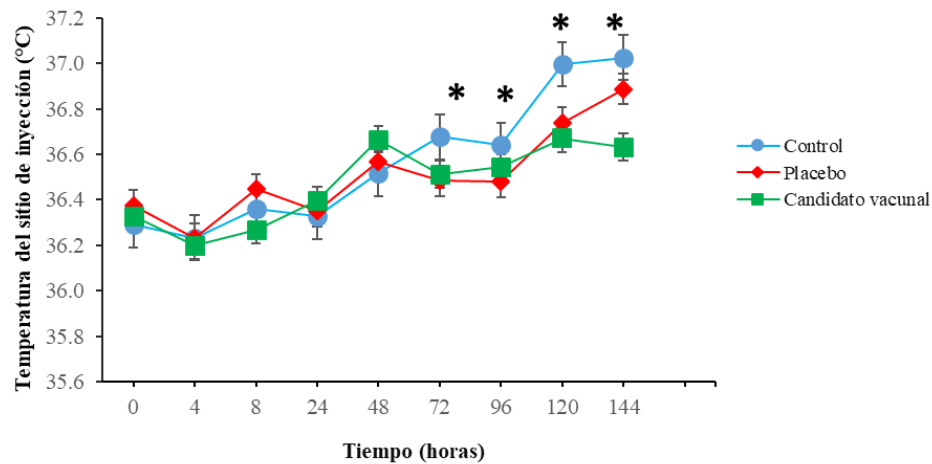


Fig. 2. Comportamiento de la temperatura del sitio de inyección de ratas Sprague Dawley macho durante la aplicación de las cuatro dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01 (0, 24, 48 y 72 h). Cada valor representa el promedio de los animales por grupo en cada tiempo \pm el error típico. Prueba de Kruskal Wallis. * $p \leq 0,05$.

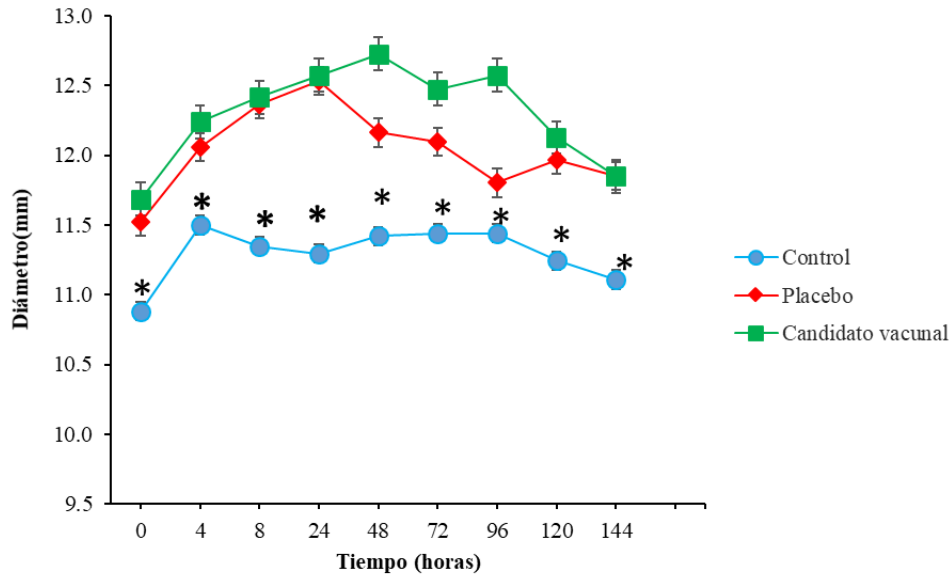


Fig. 3. Comportamiento del diámetro muscular en el sitio de inyección de ratas Sprague Dawley macho durante la aplicación de las cuatro dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01 (0, 24, 48 y 72 h). Cada valor representa el promedio de los animales por grupo en cada tiempo \pm el error típico. Prueba de Kruskall Wallis. * $p \leq 0,05$.

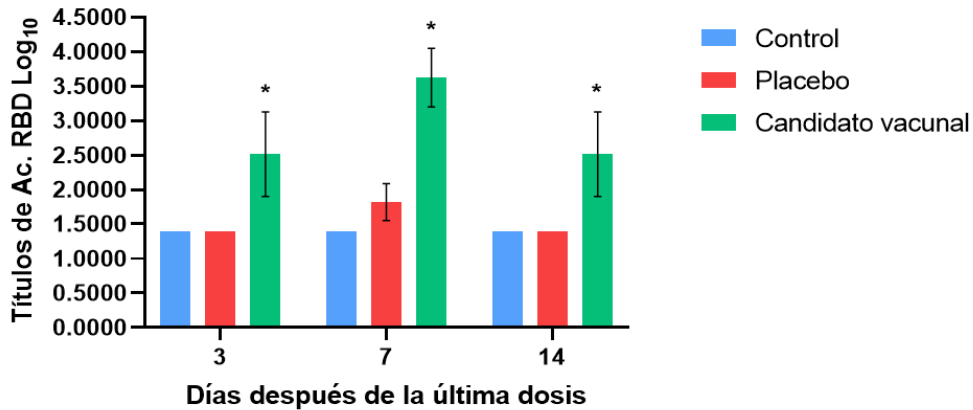


Fig. 4. Comportamiento de los títulos de anticuerpos específicos (IgG) al RBD de ratas Sprague Dawley macho después de la aplicación de la última dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01. Cada valor representa el promedio por grupo en cada tiempo \pm el error típico. Prueba de Kruskal - Wallis, * $p \leq 0,05$.

fisiológico de esta especie para su línea, edad y sexo.⁽¹⁷⁾ Por su parte, la hemoglobina no mostró diferencias entre los grupos (Tabla 1).

Evaluación inmunológica

Se detectaron anticuerpos IgG específicos contra RBD exclusivamente en los animales vacunados en todos los tiempos de eutanasia evaluados (Fig. 4). Los títulos aumentaron progresivamente desde el día 3 hasta el 14 post-inoculación, lo que sugiere una maduración de la

respuesta inmune. A los 3, 7 y 14 días, el grupo candidato vacunal mostró títulos significativamente superiores en comparación con los grupos control y placebo ($p < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis).

Estudios anatomopatológicos y pesos de órganos

A partir de los resultados anatomopatológicos macroscópicos realizados en las diferentes eutanasias, no se observaron lesiones o daños en órganos y/o tejidos que no fueran las que clasificaran como alteraciones

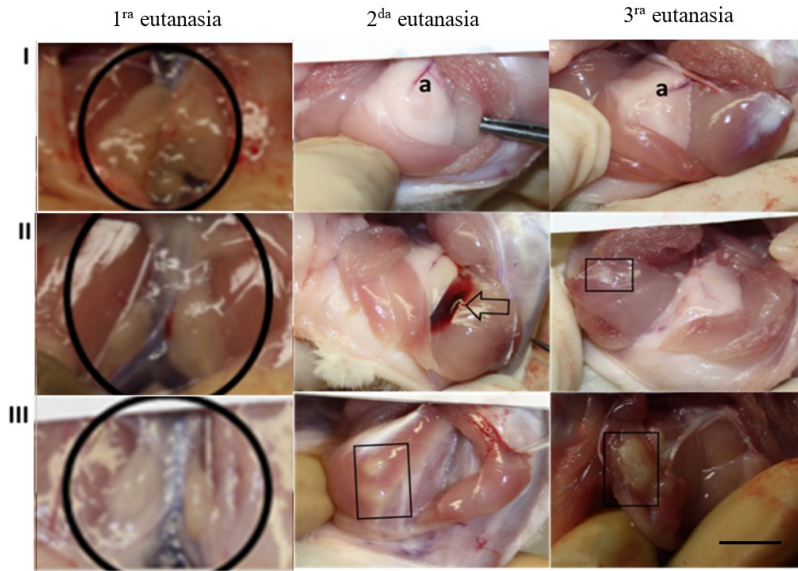


Fig. 5. Hallazgos macroscópicos relacionados con el sitio de inyección y órganos del sistema inmunológico en ratas Sprague Dawley macho. (I) Grupo control, (II) Grupo placebo, (III) Grupo Candidato vacunal. (a) Ganglios poplíteos *in situ*. Los círculos enmarcan ganglios inguinales profundos con adenitis, los rectángulos delimitan posibles formaciones granulomatosas de color blanco-gris en animales de los grupos placebo y candidato vacunal. La flecha indica una zona congestionada delimitada, relacionada con un posible trauma por la administración. Barra- 1 cm.

Tabla 2. Resumen de las alteraciones macroscópicas relacionadas con el sistema inmunológico y con el sitio de inoculación observadas en las ratas SD macho, después de la aplicación de la última dosis del candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01.

Eutanasias (días después de la última dosis)	Alteraciones observadas	Grupos/Frecuencia (%) Animales lesionados/total de animales (%)		
		Control	Placebo	Candidato vacunal
3	Múltiples formaciones difusas de color blanco-gris	0/5 (0)	3/5 (60)	3/5 (60)
	Múltiples formaciones delimitadas de color blanco-gris	0/5 (0)	4/5 (80)	2/5 (40)
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5 (0)	4/5 (80)	5/5 (100)
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5 (0)	1/5 (20)	5/5 (100)
7	Múltiples formaciones bien delimitadas de color blanco-gris	0/5 (0)	1/5 (20)	5/5 (100)
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5 (0)	4/5 (80)	3/5 (60)
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5 (0)	2/5 (40)	5/5 (100)
14	Múltiples formaciones bien delimitadas de color blanco-gris	0/5 (0)	3/5 (60)	4/5 (100)
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5 (0)	3/5 (60)	1/5 (20)
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5 (0)	3/5 (60)	5/5 (100)

asociadas a la inoculación de los tratamientos. Sin embargo, en relación con el sitio de inyección pudo observarse en las tres eutanasias la presencia de adenitis en los GIP y GP en los animales tratados con el candidato vacunal. Además, se identificaron múltiples formaciones de color blanco-gris difusas bien delimitadas en todos los animales de los grupos candidato vacunal y placebo, con menos frecuencia en este último, mientras que en los animales controles no se

observaron estos hallazgos (Fig. 5). En la Tabla 2 se resume la frecuencia de los hallazgos anatomopatológicos relacionados con el sistema inmunológico y el sitio de inyección en cada una de las eutanasias.

Discusión

Los estudios preclínicos en el desarrollo de vacunas demandan tener una especie o modelo animal relevante

que simule la enfermedad en humanos, sea susceptible al patógeno que la provoca y que responda inmunológicamente a los candidatos vacunales donde se demuestre la protección.^(4,18) En este sentido, las ratas SD han respondido inmunológicamente a los candidatos vacunales anti-SARS-CoV-2 evaluados en el IFV, elemento que corrobora la versatilidad, sensibilidad y relevancia de este modelo animal para los estudios toxicológicos.⁽¹⁶⁾

El perfil de seguridad observado en este estudio es consistente con el reportado para otros candidatos vacunales anti-SARS-CoV-2 en modelos de roedores. En un estudio de toxicidad a dosis repetidas en ratas SD adultas donde se evaluó la misma dosis de la vacuna ZF2001 que la utilizada en el estudio actual, esta no causó reacciones adversas evidentes, presentó buena seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad.⁽⁶⁾ De manera similar, estudios con la plataforma SOBERANA en ratas SD demostraron buena tolerabilidad e inmunogenicidad sin toxicidad sistémica.⁽¹⁶⁾ No obstante, otros autores no encontraron toxicidad significativa en ratas SD inmunizadas con una vacuna inactivada anti-SARS-CoV-2, aun cuando observaron reacciones locales transitorias en el sitio de inyección.⁽⁷⁾

El consumo de agua y alimento guarda estrecha relación con los síntomas clínicos y el peso corporal. En este estudio se observó un incremento de peso homogéneo en todos los grupos, sin diferencias entre ellos; este aspecto es favorable ya que indica la inocuidad del candidato vacunal. Además, se constató que los promedios de peso corporal, consumos diarios de agua y de alimento registrados fueron similares a los datos históricos reportados para esta especie, con un comportamiento similar en los tres grupos.^(16,17)

La temperatura corporal no mostró estados febriles durante las evaluaciones realizadas y, a pesar de que se observaron diferencias entre los grupos, estas no fueron relevantes, ya que desde el punto de vista individual y como promedios grupales, no se comportaron fuera del rango fisiológico reportado para la especie ($37,5 \pm 0,5$ °C).⁽¹⁷⁾ En algunos animales hubo un ligero incremento de la temperatura en el sitio de inyección con respecto a la temperatura corporal, lo que pudiera guardar relación con los procesos inflamatorios en el sitio de inyección. Sin embargo, en su mayoría la temperatura local fue

inferior a la temperatura corporal, elementos que demuestran una baja reactogenicidad del candidato vacunal.

En línea con la idea anterior, tras la medición del diámetro muscular del sitio de inyección se observó un proceso inflamatorio local en los animales correspondientes a los grupos candidato vacunal y placebo en todas las evaluaciones. Este efecto era esperado por la presencia del hidróxido de aluminio en la formulación de SOBERANA 01.⁽¹⁹⁾ Además, existen evidencias del estudio de la vacuna VA-MENGOC-BC[®], que contiene en su formulación no solo hidróxido de aluminio, sino también VME, en donde esta última juega un papel importante en la respuesta local e inmune por su diversidad antigénica, que actúa como activadora de la respuesta inmune innata y como adyuvante.⁽²⁰⁾ En consecuencia, la presencia de ambos componentes en la formulación de SOBERANA 01, posiblemente contribuyen al proceso inflamatorio local. No obstante, se observó una tendencia a la disminución de la inflamación en el tiempo, aun cuando los animales continuaron recibiendo las siguientes dosis, donde el IID fue 0 durante el estudio.

Los estudios de bioquímica sanguínea y hematología constituyen aspectos relevantes para evidenciar la seguridad de fármacos y vacunas. Tanto los resultados obtenidos de los parámetros bioquímicos sanguíneos evaluados, como de la hemoglobina, evidencian un funcionamiento correcto del sistema de órganos de los animales, aspectos que guardan relación con los estudios anatomopatológicos.

En el presente estudio se detectó un incremento de la respuesta a anticuerpos en los días 7 y 14, lo que sugiere que SOBERANA 01 podría inducir una respuesta inmune incluso en el escenario adverso de administración repetida, sin provocar una saturación del sistema inmunológico.

Por otra parte, no se observaron hallazgos anatomopatológicos que apuntaran a un efecto tóxico del candidato vacunal. En este sentido, la presencia de adenitis en los ganglios linfáticos regionales (GIP y GP), así como de formaciones blanquecinas en el sitio de inyección en animales vacunados y, en menor medida, en el grupo placebo, es consistente con la respuesta en

vacunas adyuvadas con aluminio. Las sales de aluminio forman un depósito en el sitio de inyección que promueve la inflamación y el reclutamiento de células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos drenantes.⁽²¹⁾ La mayor frecuencia y persistencia de las adenitis en animales vacunados probablemente refleja el efecto inmunoestimulador adicional del antígeno RBD y las VME, que activan vías mediadas por TLR4.⁽³⁾

Asimismo, las diferencias en los PRO de los GIP y GP, en las tres eutanasias, en el grupo candidato vacunal con respecto al control no tienen relación con un efecto tóxico y se consideran de carácter fisiológico, ya que los órganos linfoides se activan ante la presencia de cualquier antígeno, donde ocurre una respuesta inflamatoria específica a los candidatos vacunales.⁽¹⁶⁾

A partir de estos resultados, futuras investigaciones evaluarán el candidato vacunal en una muestra más amplia de ratas de ambos sexos. Asimismo, sería interesante prolongar la duración del estudio para detectar efectos a largo plazo o una posible toxicidad crónica, así como caracterizar las respuestas inmunes celulares, lo que podría proporcionar información adicional sobre su perfil de inmunogenicidad.

Este estudio piloto proporciona datos preliminares esenciales de seguridad e inmunogenicidad que respaldan la aplicación de SOBERANA 01 en humanos. De esta manera, los resultados del presente trabajo permitieron continuar la evaluación del candidato en ensayos clínicos en humanos, en los que se demostró su seguridad y eficacia.⁽²²⁾

Conclusiones

El candidato vacunal anti-SARS-CoV-2 SOBERANA 01 no evidenció efectos adversos tóxicos en las ratas SD y fue bien tolerado por vía intramuscular, por lo que se considera potencialmente no tóxico para humanos.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Mildrey Fariñas-Medina: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, supervisión, redacción-borrador original.

Tamara Hernández-Salazar: curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, redacción-borrador original.

Reynaldo Oliva-Hernández: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología.

Sandra Rodríguez-Salgueiro: investigación, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

Juan Francisco Infante-Bourzac: investigación, supervisión, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

Darcy Núñez-Martínez: investigación, supervisión, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

Ambar Oyarzabal-Vera: redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

Yisabel Aranguren-Mazorra: metodología, análisis formal, redacción-borrador original.

Laura Marta Rodríguez-Noda: supervisión, redacción-revisión y edición.

Yanet Climent-Ruiz: investigación, supervisión, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

Dagmar García-Rivera: adquisición de fondos, administración de recursos, supervisión, redacción-revisión y edición.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Shanmugaraj B, Malla A, Phoolcharoen W. Emergence of Novel Coronavirus 2019-nCoV: Need for Rapid Vaccine and Biologics Development. *Pathogens*. 2020;9(2):148. doi: <https://10.3390/pathogens9020148>.
2. Valdés-Balbin Y, Santana-Mederos D, Paquet F, Fernández S, Climent Y, Chiodo F, et al. Molecular Aspects Concerning the Use of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a Target for Preventive Vaccines. *ACS Central Science*.2021;7:757-67.
3. Santana-Mederos D, Perez Nicado R, Climent Y, Rodriguez L, Ramirez BS, Perez Rodriguez S, et al. A COVID-19 vaccine candidate composed of the SARS-CoV-2

- RBD dimer and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles. *RSC Chem Biol.* 2022;3(2):242-9. doi: <https://10.1039/d1cb00200g>.
4. Clarke DW. Preclinical Safety Assessment Considerations for Vaccine Development. In: Prasad AK. *Drug Development and Pharmaceutical Science Vaccine Development: From Concept to Clinic*; London: Royal Society of Chemistry;2022.
5. World Health Organization (WHO). Guidelines on the evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. Geneva: OMS; 2014. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/trs_987_annex2.pdf?sfvrsn=ea91caca_3&download=true. (Consultado en línea: 23 de julio de 2025).
6. Sun R, Xia L, She G, Li J, Wang Y, Chen Y, et al. Repeated-dose toxicity and immunogenicity evaluation of a recombinant subunit COVID-19 vaccine (ZF2001) in rats. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025;15:1548787. doi: <https://10.3389/fcimb.2025.1548787>.
7. Huang Z, Jiang Q, Wang Y, Yang J, Du T, Yi H, et al. SARS-CoV-2 inactivated vaccine (Vero cells) shows good safety in repeated administration toxicity test of Sprague Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2021;152:112239. doi: <https://10.1016/j.fct.2021.112239>.
8. Karabay Ü. Nonclinical safety assessment of vaccines: Up to date applications. *Ege Tıp Dergisi.*2024;63(4):644-59. doi: <https://10.19161/etd.1542896>.
9. Sewell F, Corvaro M, Andrus A, Burke J, Daston G, Delaney B, et al. Recommendations on dose level selection for repeat dose toxicity studies. *Arch Toxicol.* 2022;96(7):1921-34. doi: <https://10.1007/s00204-022-03293-3>.
10. Onuma K, Watanabe M, Sasaki N. The grimace scale: a useful tool for assessing pain in laboratory animals. *Exp Anim.* 2024;73(3):234-45. doi: <https://10.1538/expanim.24-0010>.
11. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;82:377-90.
12. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals eighth edition.* Washington DC: The National Academies Press; 2011.
13. Morton DB. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: Ethical, legal and practical aspects. En: Hendriksen CFM, Morton DB (eds.). *Humane Endpoints in Animal Experimentation for Biomedical Research.* London: Royal Society of Medicine Press;1999. p. 5-12.
14. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013.
15. Food and Drug Administration (FDA). Nonclinical Safety Evaluation of the Immunotoxic Potential of Drugs and Biologics Guidance for Industry. Rockville, MD: FDA;2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nonclinical-safety-evaluation-immunotoxic-potential-drugs-and-biologics-guidance-industry>. (Consultado en línea: 23 de julio de 2025).
16. Oliva-Hernández R, Fariñas-Medina M, Hernández-Salazar T, Oyarzabal-Vera A, Infante-Bourzac JF, Rodríguez-Salgueiro S, et al. Repeat-dose and local tolerance toxicity of SARS-CoV-2 FINLAY-FR-02 vaccine candidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology.* 2022;471:153161. doi: <https://10.1016/j.tox.2022.153161>.
17. Charles River Laboratories [Homepage on the internet]. Wilmington MA: Charles River Labs-Research Models, Sprague Dawley Rat Informational Resources; c2018-06. Disponible en: <https://www.criver.com/products-services/find-model/sas-sprague-dawley-rat?region=3616>. (Consultado en línea: 23 de julio de 2025).
18. Kandeil A, Mostafa A, Hegazy RR, El-Shesheny R, El Taweel A, Gomaa MR, et al. Immunogenicity and Safety of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine: Preclinical Studies. *Vaccines (Basel).* 2021;9(3):214. doi: <https://10.3390/vaccines9030214>.
19. Danielsson R, Eriksson H. Aluminium adjuvants in vaccines -A way to modulate the immune response. *Semin Cell Dev Biol.*2021;115:3-9. doi: <https://10.1016/j.semcdb.2020.12.008>.
20. Oliva-Hernández R, Fariñas-Medina M, Infante-Bourzac JF, Hernández-Salazar T, Núñez-Martínez D, Quintero-Pérez A, Sierra-González G. Estudio de tolerancia local de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® en ratas Sprague Dawley. Evaluación a los 24 y 36 meses en estante. *VacciMonitor.*2019;28(1):9-18. Disponible en: <https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccimonitor/article/view/208/365>. (Consultado en línea: 23 de julio de 2025).
21. Carvalho JC, Cunha F, Coutinho IA, Loureiro C, Faria E, Bom AT. Hypersensitivity Reactions to Vaccines: Current Evidence and Standards for SARS-CoV-2 Vaccines. *Acta Med Port.* 2021;34(7-8):541-7. doi: <https://10.20344/amp.16096>.
22. Pérez-Rodríguez S, de la Caridad Rodríguez-González M, Ochoa-Azze R, Climent-Ruiz Y, González-Delgado CA, Paredes-Moreno B, et al. A randomized, double-blind phase I clinical trial of two recombinant dimeric RBD COVID-19 vaccine candidates: Safety, reactogenicity and immunogenicity. *Vaccine.* 2022;40(13):2068-75. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2022.02.029>.

Pilot study of toxicity and immunogenicity of the SARS-CoV-2 SOBERANA 01 vaccine candidate in Sprague Dawley rats

Abstract

At Finlay Institute of Vaccines, the anti-SARS-CoV-2 vaccine candidate SOBERANA 01 was developed, which contains the receptor-binding domain in its dimeric form, outer membrane vesicle from *Neisseria meningitidis* serogroup B and aluminum hydroxide as an adjuvant. The aim of this study was to evaluate the safety of the anti-SARS-CoV-2 vaccine candidate SOBERANA 01 through a pilot study of repeated-dose toxicity and immunogenicity in Sprague Dawley rats. Forty-five male Sprague Dawley rats (250–300 g), divided into three groups: control, placebo (excipients), and vaccine candidate were used, wherein the substances were administered intramuscularly for 4 days. During the study, physiological status, pain, body weight, water and food intake, body and injection site temperature values, muscular diameter, and local irritation were assessed. On days 3, 7, and 14 post-inoculation, blood biochemistry parameters, hemoglobin, immunological evaluation, anatomopathological studies, and organ weight were determined. No deaths were reported, nor were there differences between the groups associated with the test substance in terms of body weight, body and inoculation site temperature, muscular diameter, skin irritability, blood biochemistry parameters, hemoglobin, or any anatomopathological alterations of diagnostic value. Additionally, SOBERANA 01 has induced high titers of anti-RBD IgG. In conclusion, the anti-SARS-CoV-2 vaccine candidate SOBERANA 01 was immunogenic, showed no toxic adverse effects and was well tolerated via intramuscular administration in Sprague Dawley rats; therefore, it is considered potentially non-toxic for humans.

Keywords: SARS-CoV-2 vaccines; toxicity; vaccine immunogenicity; Sprague Dawley rats.

Recibido: 12 de diciembre de 2025

Aceptado: 8 de junio de 2026