

Algunas consideraciones sobre los estudios de inmunotoxicología de un nuevo adyuvante vacunal.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola,^{*} Luis Alfredo Rosario Fernández,^{} Yulieé López Feria,^{*} Daiyana Díaz Rivero.^{*}**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

² Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

³ Doctor en Medicina Veterinaria.

⁴ Técnico Medio en Veterinaria.

Centro de Trabajo:

^{*}Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

^{**}Centro de Química Biomolecular (CQB), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfono del Centro de Trabajo: 057(2716911).

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola, email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En nuestros días se destaca el uso de adyuvantes en la mayoría de los candidatos vacunales, como potenciadores de la respuesta inmunológica, pero por lo general los adyuvantes existentes presentan efectos adversos e indeseables, sobre todo de índole tóxica, resultados que han servido para afirmar por varios conocedores y estudiosos de esta materia que para ellos no existe el adyuvante ideal. Esta revisión tiene como objetivo dar a conocer algunas consideraciones sobre los estudios de inmunotoxicología requeridos en un nuevo adyuvante vacunal. Tuvimos en cuenta los valores que determinan toxicidad general en el sistema inmune. Estudios que se pueden incluir de forma general en el registro del nuevo adyuvante vacunal, componentes generales y componentes específicos el cual incluye hematología y química clínica, análisis anatomopatológico de todos los órganos y pesos de los órganos linfoides, examen histopatológico, respuesta de anticuerpos T dependiente, inmunofenotipo, así como el ensayo de actividad celular de las células asesinas naturales NK, la función de macrófagos/neutrófilos y por ultimo los ensayos para medir la inmunidad mediada por células. Son numerosas las evaluaciones a llevar a cabo para poder registrar y validar un nuevo adyuvante, donde el componente inmunotoxicológico tiene una gran importancia, las cuales permiten determinar el efecto tóxico a todos los niveles posibles, esto a nuestro criterio ha servido para disminuir el riesgo a efectos indeseables de las vacunas utilizadas en humanos y en los animales.

Palabras clave: Inmunotoxicología, ensayos, nuevo adyuvante vacunal.

Abstract

Some considerations on the immunotoxicology studies for a novel vaccine adjuvant.

In our days its stands out the adjuvants use in most of the vaccine candidates, as enhancers of the immune response, but in general the adjuvants existen, presents adverse and undesirable effects, mainly of toxic nature, results that they have been good to affirm for several experts and studios of this matter that for them the ideal adjuvant doesn't exist. This revision has as objective to give some considerations on the immunotoxicology studies required in a novel vaccine adjuvant. We kept in mind the values that determine general toxicity in the

immune system. Studies that can be included in a general way in the registration of the novel vaccine adjuvant, general components and specific components which includes hematology and clinical chemistry, anatomopatologic analysis of all the organs and the lymphoid organs weight , histopatologic exam, T dependent antibodies response, immunophenotyping, as well as the cellular activity of the natural killer (NK) cells activity assays, macrophage/neutrophil function and lastly the assays to measure cells-mediated immunity. They are numerous the evaluations to carry out to be able to register and to validate a novel adjuvant, where the immunotoxicologic component has a great importance, which allow determining the toxic effect at all the possible levels, this to our approach has been to diminish the risk to undesirable effects of the vaccines used in human and animals.

Key words: Immunotoxicology, assays, novel vaccine adjuvant.

Introducción

En nuestros días se destaca el uso de adyuvantes en la mayoría de los candidatos vacunales, como potenciadores de la respuesta inmunológica, pero por lo general los adyuvantes existentes presentan efectos adversos e indeseables, sobre todo de índole tóxica, resultados que han servido para afirmar por varios conocedores y estudiosos de esta materia que para ellos no existe el adyuvante ideal.¹

En general, los antígenos solubles puros, recombinantes o sintéticos han resultado seguros, pero con una menor inmunogenicidad en comparación con aquellos del organismo de origen. Es por eso que la búsqueda de adyuvantes nuevos y atóxicos, así como el desarrollo de nuevos sistemas de envío de antígenos, son necesidades de la investigación en el campo de las vacunas.

El desarrollo de vacunas efectivas contra la gran cantidad de patógenos que permanecen en las superficies mucosales o que tienen en ellas su puerta de entrada, requiere adyuvantes que potencien respuestas locales. Otras razones económicas y logísticas apoyan el desarrollo de adyuvantes para las vacunas mucosales.²

Esta revisión tiene como objetivo dar a conocer algunas consideraciones sobre los estudios de inmunotoxicología requeridos en un nuevo adyuvante vacunal. Tuvimos en cuenta los valores que determinan toxicidad general en el sistema inmune. Estudios que se pueden incluir de forma general en el registro del nuevo adyuvante vacunal, componentes generales y componentes específicos el cual incluye hematología y química clínica, análisis anatomopatológico de todos los órganos y pesos de los órganos linfoides, examen histopatológico, respuesta de anticuerpos T dependiente, inmunofenotipo, así como el ensayo de actividad celular de las células asesinas naturales NK, la función de macrófagos/neutrófilos y por último los ensayos para medir la inmunidad mediada por células.

Desarrollo

La forma más clásica de medir la inmunotoxicidad de un adyuvante o sustancia en general, es mediante la evaluación de su efecto en las 4 categorías:

- ❖ Inmunosupresión.
- ❖ Inmunoestimulación.
- ❖ Hipersensibilidad.
- ❖ Autoinmunidad.

Pero dada que estos temas en materia de investigación son bastante candentes y hoy todavía no están descritos por la agencia reguladora EMEA, los ensayos validados y necesarios para tener un panorama general de tu sustancia a evaluar, se hace necesario establecer al menos modelos que te indiquen el estado del sistema inmune a dosis altas de producto a evaluar. Por lo general dentro de estas 4 categorías la que más se desarrolla es la de hipersensibilidad, para la cual si están descritos sus componentes y tipos.

✓ **Reacción de hipersensibilidad tipo I.**³

Es mediada por IgE al unirse a receptores de alta afinidad de mastocitos o basófilos. El entrecruzamiento de IgE-Alérgeno desencadena los mecanismos de señalización intracelular que provocan degranulación y liberación de mediadores bioactivos (moléculas efectoras inmunes). Llamada anafiláctica donde existe interacción del alérgeno con anticuerpos del tipo IgE que se encuentran en la superficie de los basófilos y mastocitos, con la liberación de histamina, cininas y prostaglandinas, produciendo vasodilatación capilar, contracción del músculo liso y edema.

Efectos: contracción del músculo liso y vasodilatación. La manifestación clínica incluye la fiebre de heno, rinitis y asma.

✓ **Reacción de hipersensibilidad tipo II o citotóxica.**⁴

Loa anticuerpos (Ac) reacciona contra determinantes antigénicos de la superficie celular. Muerte celular mediada por complemento.

Las RAM se debe a la fijación del complemento antígeno-anticuerpo presente en la superficie de algunas células (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas), produciendo lisis de la célula.

Este tipo de reacción puede provocar, anemia hemolítica, agranulocitosis y púrpura trombocitopénica.

Lesión tisular en la hipersensibilidad tipo II:

- Rápida fagocitosis de células blanco sensibilizadas con Ac.
- Lisis de células blanco mediada por Complemento.
- Daño tisular, "espectadores inocentes" por enzimas líticas y EROs.
- Bloquea funciones celulares la unión de Ac a célula blanco.

✓ **Reacción de hipersensibilidad tipo III.**⁵

Cuando el complejo antígeno-anticuerpo se deposita en células del tejido blanco. Ocurre cuando se activa el sistema del complemento y se produce daño tisular mediante liberación de enzimas lisosomales.

Mediada por inmunocomplejos (IC) Ag-Ac o IC, generalmente eliminados por fagocitos.

Cuando IC persiste se depositan en tejidos y provocan este tipo de reacción:

Infección persistente: cantidad pequeña de agentes infecciosos y respuesta de Ac débil provoca formación crónica de IC.

Enfermedades autoinmunes: producción de autoanticuerpos genera sobreproducción de IC que se depositan en tejidos.

Inhalación crónica de Ag: depósito de IC en alvéolos (alveolitis alérgica extrínseca).

✓ **Reacción de hipersensibilidad tipo IV.**⁶

Producto de una interacción directa entre un alérgeno y los linfocitos sensibilizados, produciendo liberación de linfocinas.

Mecanismo de inmunidad celular, activación de células TDHT sensibilizadas por Ag e induce liberación de citocinas que actúan como moléculas efectoras.

Efecto final de las citocinas: activación y acumulación de monocitos en el tejido con la consecuente liberación de enzimas líticas que ocasionan daño tisular.

Hipersensibilidad retardada (tres tipos):

Por contacto: Reacción eczematosa, contacto con el alérgeno (metales, plantas, etc), 48-72 horas. Alergenos, Ag incompletos o haptenos, forman conjugados con proteínas de la piel.

Fase de sensibilización: 10-14 días, complejo hapteno-proteína y presentado por CD en ganglios regionales a TCD4+.

Fase de respuesta: ulteriores aplicaciones, en pocas horas: provoca activación de TCD4+ sin migrar a ganglio y liberan INFs e ILs que atraen monocitos y linfocitos a la zona.

1. Inmunotoxicidad:

Los adyuvantes pueden influir en la regulación y activación de linfocitos T como auxiliares o en subconjunto en todas las células del sistema inmune, por lo cual puede ser un factor limitante de aumento o disminución de los niveles de citoquinas como IFN, IL-4, IL-5, en inmunoglobulinas tales como la IgE, jugando un papel en el riesgo a la aparición o en vías de desarrollo de hipersensibilidad o autoinmunidad. En nuestros días los modelos animales no se han podido estandarizar de forma tal que en un solo ensayo se pueda definir la aparición de una u otra o de ambas asociadas a adyuvantes vacunales y vacunas. Sin embargo, se consta con varios modelos existentes que evalúan la inmunotoxicidad de otros productos como inmunoterapéuticos, los cuales podrían ser refinados para la evaluación de nuevos adyuvantes vacunales y de vacunas, tal es el caso del ensayo de anafilaxis cutánea pasiva, el ensayo del nódulo de linfático local, así como modelos *in vivo* para detectar enfermedades autoinmunes.⁷

Si durante las investigaciones y estudios de toxicidad clásica para un nuevo adyuvante, los resultados dan indicaciones de que el mismo influye de forma negativa en el sistema inmune entonces este producto debe llevar este tipo de pruebas, de no ser así no se deben realizar ya que las mismas son muy costosas. Administrado el adyuvante por dosis única o repetida según el esquema inmunológico en la formulación vacunal, debe administrar o esperar por un periodo de 4 semanas, formándose los grupos de 10 ratas/sexo/grupo según dosis y según la ruta de administración indicada para el uso en el humano.⁸

Valores que determinan toxicidad general en el sistema inmune.⁹

1. Peso animal una vez a la semana durante la experiencia.
2. Consumo de alimento y agua, dos en la semana, durante la experiencia.
3. Observaciones clínicas dos veces al día en la mañana y en la tarde, mortalidad, síntomas clínicos de toxicidad.

Perfil hematológico (hemoglobina, hematocrito, eritrocitos totales), leucograma en frotis sanguíneo en 100 células (determinar el número de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos).

Estudios a incluir de forma general en el registro del nuevo adyuvante vacunal: ¹⁰

Determinar los niveles de IgE en todos los animales en un pool de suero (hipersensibilidad tipo 1 mediada por anticuerpos, retardada). En otros estudios se procede a determinar mediante el ensayo de linfoproliferación de bazo los niveles de IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 (las mismas disminuye los niveles IgE), IL-1, IL-6, IL-8 (Inflamación=Hipersensibilidad de tipo 4), IFN γ , IFN β . Se da a conocer la relación CD4+/CD8+ (Valores de TH₁ y TH₂) a través de citometría de flujo. En un número grande de artículos diferentes autores determinan los niveles de IgG, tipo de sensibilidad mediada por células, siempre teniendo en cuenta la diferenciación con la respuesta humoral protectora de forma relativa pues aún no existe un ensayo validado que permite diferenciar de forma absoluta ambas respuestas.

Citoquinas:

TH₁= IL-2, TNF β , IFNs γ (pro-inflamatorio), IFNs β . esta última inhibe la IgE= Hipersensibilidad retardada.

TH₂= IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13=Producción de IgE.

- Componentes Generales:

Hematología, conteo total y diferencial de leucocitos como parámetro de inmunotoxicidad, niveles de globulinas y relación albúmina/globulina. Análisis anatomopatológico de órganos y tejidos linfoides. Determinar el peso del timo, bazo y nódulos linfáticos. Además realizar el análisis histológico del timo, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y placas de Peyer.¹¹

- Componentes Específicos:

Hematología y química clínica.

Al evaluar los cambios en los niveles de la globulina, deben tomarse otros factores, como por ejemplo nefrotoxicidad. Los cambios en las globulinas del suero pueden ser indicativos de que existen cambios en las inmunoglobulinas del suero. Aunque en el suero las inmunoglobulinas son un indicador insensible de immuno-supresión, la presencia de cambios en los niveles de

inmunoglobulinas puede ser útil en ciertas situaciones para entender bien el blanco de las poblaciones celulares o el mecanismo de acción del adyuvante.¹²

Análisis anatomopatológico de todos los órganos y pesos de los órganos linfoides.

Todos los tejidos linfoides deben evaluarse en su totalidad para observar posibles cambios durante la necropsia. Sin embargo, esto puede ser más difícil en el caso de las placas de Peyer de roedores debido al tamaño tan pequeño. Debe tomarse el peso del bazo y del timo. Para minimizar la variabilidad de los pesos de los órganos se recomienda que deban ser desangrados completamente los animales durante la necropsia.¹³

Examen de histopatológico.

Los cambios histopatológicos del bazo y del timo deben evaluarse como un indicador de inmunotoxicidad sistémica. El tejido linfático en contacto con el sitio donde se aplicó la dosis más alta del adyuvante debe ser examinado. Debe incluir en estos sitios las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos de ser administrado el producto de forma oral, el tejido linfático y bronquios asociados (BALT) si el adyuvante es administrado por inhalación, los tejidos linfoides nasal asociados (NALT) para los que son administrados por vía nasal (si es posible), y en los administrados por vía parenteral debe analizar los nódulos linfáticos proximales.¹⁴

Respuesta de anticuerpos T dependiente (RATD).

Deben justificarse los puntos finales de cada investigación como el punto más apropiado para el ensayo escogido y la especie seleccionada. Los niveles de anticuerpos pueden medirse utilizando la técnica de ELISA u otros métodos de inmunoensayo. La ventaja de este método es que antes de que se formen los anticuerpos dados por respuesta inmunológica estos pueden ser coleccionados de forma consecutiva durante el estudio lo cual permite realizar una curva de cinética de la respuesta.¹⁵

Inmunofenotipo.

Los niveles y fenotipos de linfocitos T y B deben determinarse en sangre periférica, médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos. Debe utilizar la técnica de citometría de flujo para determinar el número por fenotipo de cada una de las células inmunes. Sin embargo, puede usarse la citometría de flujo también para medir la respuesta inmune antígeno-específica de

linfocitos. Los linfocitos deben ser obtenidos de sangre periférica. Se recomienda que los números absolutos de subconjuntos de linfocitos así como los porcentos de cada uno se interpreten y evalúen relacionándolos con el tratamiento.¹⁶

Uno de las ventajas de la inmunohistoquímica por encima de la citometría de flujo es que los tejidos pueden analizarse en los estudios de toxicidad clásica de forma retrospectivamente si las señales de inmunotoxicidad son observadas. Además puede observarse los cambios en los tipos de células dentro de un compartimiento específico del tejido del linfoide. Algunos de los marcadores de linfocitos en algunas especies son sensibles a la fijación con formalina y sólo puede localizarse en el tejido con el uso de ciertos fijadores utilizados de forma rápida y con hielo desbancándose como una desventaja del proceso. Por lo cual la cuantificación e intensidad de leucocitos es más difícil con el uso de la inmunohistoquímica.¹⁷

Cuando se usan los estudios de inmunofenotipo para caracterizar o identificar las alteraciones específicas en las poblaciones de leucocitos, la opción de los órganos linfoides y/o sangre periférica para ser evaluados debe ser basada en cambios realmente observados. La inmunofenotipificación puede agregarse fácilmente en los estudios de toxicidad por dosis repetidas de forma escalonada, ya que permite estudiar los cambios durante el periodo de exposición según los niveles de dosis.¹⁸

Ensayo de actividad celular de las células asesinas naturales NK.

Este ensayo puede realizarse si los estudios de inmunofenotipo demostraron un cambio en el número de este tipo de célula. En general este ensayo es *ex vivo*, donde los tejidos por ejemplo el bazo o la sangre se obtiene de los animales que se han tratado con el adyuvante. Se co-incuban las preparaciones celulares con células designadas las cuales se han marcado con Cromo⁵¹. Pueden usarse nuevos métodos que involucran el no marcaje con sustancias radioactivas adecuadamente validadas para de esta forma la evaluación quede menos compleja y riesgosa para el personal que la realiza. Deben evaluarse diferentes efectos en las proporciones o dosis designada para cada ensayo, y así obtener un nivel suficiente de datos de citotoxicidad lo cual permite generar una curva/respuesta.¹⁹

Función de Macrófagos/Neutrófilos.

El ensayo funcional *in vitro* de macrófagos y neutrófilos se basa en analizar la funcionalidad en cuanto a (fagocitosis, estallido oxidativo, quimiotaxis y actividad citolítica), estos ensayos se han publicado y validado para varias especies. Evalúan la funcionalidad de macrófagos y neutrófilos de células expuestas a la sustancia a prueba *in vitro* u obtenidas de animales tratados con el adyuvante (ensayos *ex vivo*). El ensayo *in vivo* también permite la evaluación de los efectos dentro de las células retículoendoteliales para fagocitar sustancias radioactivas o marcadas con blancos fluorescentes.²⁰

Ensayos para medir la inmunidad mediada por células.

No se han establecido ensayos para medir la inmunidad mediada por células para saber la respuesta dada por anticuerpos al ser diferenciada de la humoral o protectora. Por lo general se realizan ensayos *in vivo* dónde se usan los antígenos para la sensibilización. Los ensayos realizados hasta el momento se han hecho mediante el tipo de reacción de hipersensibilidad retardada con reacciones de inmunización con proteínas y desafío en ratones y ratas. Se han explorado modelos en que se usan ratones sensibilizados pero no se encuentran validados y no están extensivamente usados. La respuesta de células T citotóxicas generadas en ratones se ha estudiado en virus y líneas de células tumorales así como el desafío antigénico obteniéndose buenos resultados, sin embargo estas reacciones en los monos son muy difíciles de reproducirse de forma consistente según el informe final de la EMEA en el año 2004 y publicado como regulación en el 2006. Además, uno debe asegurarse de que está respuesta no está equivocada para un anticuerpo o mediada por el complemento llamado reacción de Arthus.²¹

Conclusiones

Concluimos que son numerosas las evaluaciones a llevar a cabo para poder registrar y validar un nuevo adyuvante, donde el componente inmunotoxicológico tiene una gran importancia, las cuales permiten determinar el efecto tóxico a todos los niveles posibles, esto a nuestro criterio ha servido para disminuir el riesgo a efectos indeseables de las vacunas utilizadas en humanos y en los animales.

Referencias Bibliográficas

1. Vogel FR. Adjuvants in perspective. In: Brown F, Haaheim LR, editors. Modulation of the immune response to vaccine antigens. Dev Biol Stand Vol 93. Basel: Karger, 1998; p. 241-248.
2. Aguilar JC, Leal MJ. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. Biotec Aplic 2000; 17(3):147-160.
3. Shoenfeld Y, Aron-Maor A. Vaccination and autoimmunity-‘vaccinosis’: a dangerous liaison? J. Autoimmun 2000; 14:1-10.
4. Scardino A, Correale P, Firat H, Pellegrini M, Kosmatopoulos K, Opolon P. *In vivo* study of the GC90/IRIV vaccine for immune response and autoimmunity into a novel humanised transgenic mouse. Br J Cancer 2003; 89:199-205.
5. Bomford R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? In: Brown F, Haaheim LR, editors. Modulation of the immune response to vaccine antigens. Dev Biol Stand Vol 92. Basel: Karger, 1998; p. 13-18.
6. Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants. Molecular Biotec 2002; 21(2):129-148.
7. Gerberick G.F, Ryan C.A, Kimber I. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. American Journal of Contact Dermatitis 2000; 11(1):3-18.
8. Arencibia D.F, Rosario L.A. Actuales y futuras perspectivas para la evaluación inmunotoxicológica. Retel (Revista de Toxicología en Línea) 2009; 23(1):1-7.
9. Weaver JL, Tsutsui N, Hisada S, Vidal JM, Spanhaak S. Development of the ICH guidelines for immunotoxicology evaluation of pharmaceuticals using a survey of industry practices. J Immunotoxicol 2005; 2:171-81.
10. Arencibia D.F, Rosario L.A, Batista N, Ortiz L, López Y, Blain K. Inmunidad e hipersensibilidad. Retel (Revista de Toxicología en Línea) 2009; 22(4):38-54.
11. STP Position paper: Best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. STP Immunotoxicology Working Group. Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G. Toxicol Pathol 2005; 33: 404-7.

12. Kioukia-Fougia N, Antoniou K, Bekris S, Liapi C, Christo-fidis J, et al. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid, hormones and glucose levels. *Progr Neuro-Psychopharm Biol Psychol* 2002; 26:823–30.
13. Kuper CF, Harleman JH, Richter-Reichhelm HB, Vos JG. Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity. *Toxicol Pathol* 2000a;28:454–66
14. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ. Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol Lett* 2003; 140–141:281–5.
15. Van der Laan J, van Loveren H. Current status and burning issues in immunotoxicity testing of drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(Suppl.):435–40.
16. Ulrich P, Paul G, Perentes E, Mahl A, Roman D. Validation of immune function testing during a 4-week oral toxicity study with FK506. *Toxicol Lett* 2004; 149: 123–31.
17. Ward JM, Uno H, Frith CH. Immunohistochemistry and morphology of reactive lesions in lymph nodes and spleen from rats and mice. *Toxicol Pathol* 1993; 21: 199–205.
18. Bruder MA, Spanhaak S, Bruijntjes JP, Michielsen CPPC, Vos JG, Kuper CF. lymphocytes of different rat strains in immunotoxicity. *Toxicol Pathol* 1999; 27:171–9.
19. Germolec D.R. Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune endpoints and disease resistance. *Toxicol Lett* 2004; 149:109-114.
20. Arévalo M, Arredondo S, Walter T, Heresi G. Techniques to evaluate the phagocytic, opsonizing and bactericidal ability of the polymorphonuclear leukocyte. *Rev. chil. tecnol. Méd* 1986; 9(1):383-8.
21. EMEA. Guideline on Adjuvants in Vaccines. Strategies and validation in preclinical studies in murine models. (CPMP/VEG/17/03/2004v5/Consultation) 2006 .p.5-8.

Recibido: 22/12/09

Aceptado: 28/12/09