



Nuevos adyuvantes en las vacunas veterinarias

Nicolás Guerra

Marketing Manager de la Unidad de Negocio Porcino. HIPRA

Introducción

Las primeras descripciones sobre el uso de adyuvantes datan de los años veinte (Schijns, 2001) y la lista de sustancias con propiedades adyuvantes ha ido creciendo desde entonces, paralelamente al desarrollo tecnológico en el campo de las vacunas (formulación de subunidades, péptidos, fragmentos de ácidos nucleicos, etc.). La inmunología moderna de las últimas décadas ha abierto las puertas a estudios detallados sobre las propiedades inmunológicas de estas sustancias y al desarrollo de nuevos y más potentes adyuvantes.

Aspectos clave de inmunología

Algunos de los avances más recientes en la inmunología moderna son la descripción de los

sistemas de receptores de reconocimiento de patógenos (RRP) como los receptores tipo Toll o TLR (Toll-like receptors), y el papel principal de las células dendríticas en el desarrollo de la respuesta inmune (Iwasaky Et al. 2004).

El desarrollo de las vacunas explota estos avances para estudiar y diseñar mejores adyuvantes según estos conocimientos. Por tanto, la línea de trabajo principal que parecen tener los adyuvantes es la de establecer un vínculo muy fuerte entre la respuesta inmunológica inespecífica y la respuesta inmunológica específica (Werling et al. 2003, Mazzoni et al, 2004, Garlapati et al, 2008). Como breve descripción de las primeras reacciones de la respuesta inmunológica en el punto de inoculación de la vacuna, diremos que son las células presentadoras de antígeno (CPA), principalmente los macrófagos y las células dendríticas (CD), las responsables de capturar el antígeno y presentarlo al resto del sistema inmunológico. Las CD se pueden encontrar en todo el cuerpo, en tejido subcutáneo o muscular para las vacunas aplicadas mediante inyección, así como en teji-

dos de mucosa para vacunas aplicadas oralmente o por vías respiratorias. Una vez los antígenos han sido capturados, las CPA desencadenarán la respuesta inmunológica adaptativa.

Tradicionalmente, la inmunidad innata y específica se entendían como vías independientes dentro de la respuesta inmunológica. Pero en realidad ambos tipos de respuesta están muy unidos, al menos durante los primeros pasos en el desarrollo de una respuesta inmune. De esta forma, hoy sabemos que las clásicas estrategias del sistema innato para reconocer patógenos tienen una gran trascendencia en la respuesta específica generada. (Werling et al, 2003). Estas estrategias están basadas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP de las siglas en inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) por las células mononucleares. Los receptores tipo Toll (TRL) y otros sistemas RRP de las células mononucleares son las principales vías de reconocimiento de los PAMP que utilizan estas células para reconocer la presencia del patógeno y estimular la maduración de las células dendríticas. Finalmente, se ha descrito que el ginseng es capaz de estimular las células mononucleares mediante la vía de los TLR-4 (Nayaka et al, 2004).

Las saponinas del ginseng como adyuvante

Con este resumen inmunológico, la respuesta inmunológica vacunal debería entenderse como el resultado de todos los componentes a la vez. En el caso de Hipramune® G (el nuevo adyuvante lanzado por los laboratorios HIPRA para su vacuna Suiseng®), se incluye un componente de aluminio (hidróxido de aluminio) y un extracto de origen vegetal (las saponinas del ginseng) (Sun et al. 2008, Rivera et al. 2003).

Las saponinas del ginseng (los gingenósidos) son el ingrediente farmacológicamente activo de los extractos de esta raíz. Estas saponinas, a diferencia de otras también de origen vegetal, presentan una baja toxicidad y efecto hemolítico que las hace idóneas para su uso como adyuvantes vacunales.

Se han descrito diferentes efectos inmunológicos de la raíz del ginseng (*panax ginseng*) en la literatura científica. Si empezamos con una respuesta inespecífica más primaria, algunos autores han descrito un aumento general de las reacciones oxidativas y la fagocitosis de los leucocitos poli-

morfonucleares y células macrofágicas (Oh et al, 2004). Además, se ha observado la proliferación de células inmunológicas en numerosos estudios gracias a la acción de los gingenósidos. Esto ha sido descrito en células de ratón, bovino, aves y conejos (Joo et al. 2004, Sun et al. 2005).

Si nos focalizamos más en la respuesta inmune específica frente a determinados antígenos, la mayoría de los artículos publicados estudian estimulación de anticuerpos específicos gracias a los efectos del ginseng. El aumento de inmunoglobulinas específicas ha sido demostrado en numerosas especies, entre ellas el ratón, la rata, el conejo, el pollo, el cerdo y también los humanos (Scaglione et al. 1996).

Algunos estudios han conseguido caracterizar el patrón de citoquinas expresadas después de una estimulación con derivados del ginseng. De esta forma, Keranova et al. (1990) observó un aumento en la expresión de interleuquina (IL)-1 en macrófagos de ratón. El mismo efecto fue descrito por Nayaka et al, en el 2004, así como un aumento en la IL-6 e INF γ . Kim et al. (1998) describió un aumento de la IL-2 en linfocitos estimulados. En otro trabajo con células de bazo de ratón, describió como el gingenósido F3 inducía el aumento de la síntesis de IL-2 y INF γ así como una reducción de la expresión de la IL-4 y IL-10. (Yu et al 2004). Larsen et al. (2004) describió una potenciación de la síntesis de IL-12 en células mononucleares periféricas sanguíneas de humanos (PBMC) estimuladas in vitro y sugirió que podía haber una fuerte inducción de la respuesta inmune TH1.

Sin embargo, otros grupos de investigación (Lee et al, 2004) descubrieron que los gingenósidos podían inducir un aumento en la síntesis de citoquinas IL-2 e IL-4 en linfocitos T CD4+. Con estas observaciones y otros resultados del trabajo, los autores sugirieron que el ginseng podía inducir una respuesta inmunológica Tipo 2 (Th2). Otro

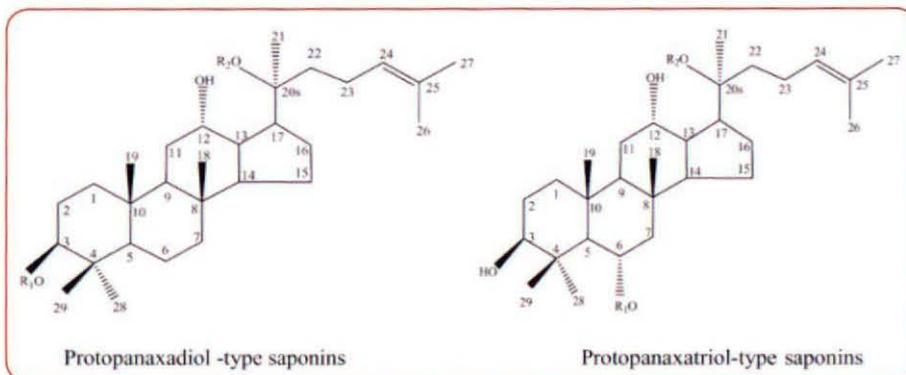


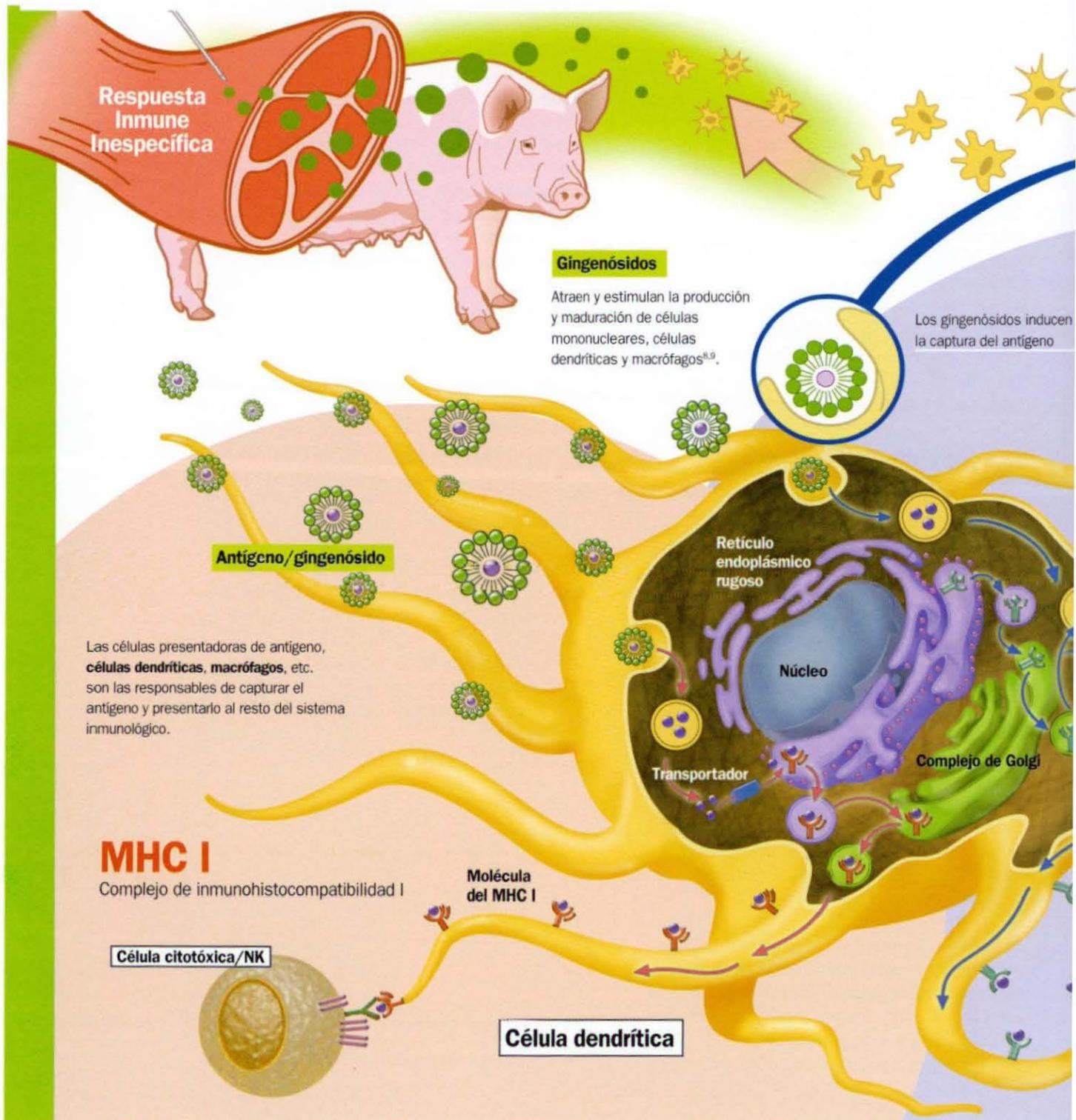
Figura 1: Estructura química de los gingenósidos (Sun et al, 2007)



estudio publicado el mismo año (Liou et al, 2004) demostró que el ginseng inducía un aumento en la expresión de Th1 (relacionado con IL-2 y IFN γ) así como Th2 (relacionado con IL-4 e IL-10). Estos autores también observaron el aumento de

IgG, IgM e IgA gracias a la estimulación con ginseng. El trabajo concluye que el extracto de ginseng puede regular la producción de anticuerpos mediante el estímulo en la síntesis de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN γ) y tipo Th2 (IL4, IL10)

Las directrices en el desarrollo de nuevos adyuvantes tienen un papel determinante en la mediación y establecimiento de un vínculo entre la Respuesta Inmune Inespecífica y la Respuesta Inmune Adaptativa⁶.



Hipramune® G: saponinas del ginseng más hidróxido de aluminio

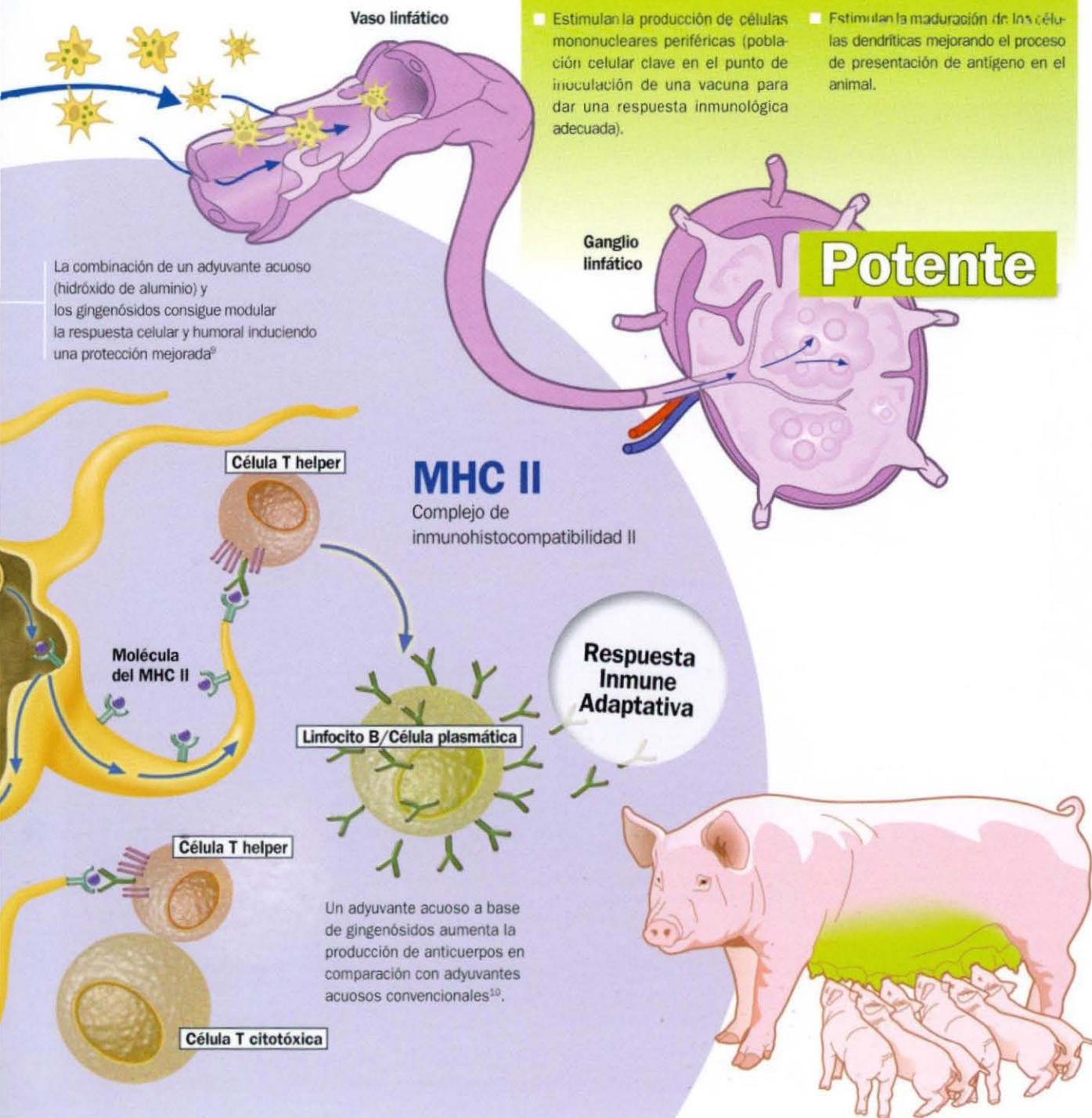
En la búsqueda del adyuvante ideal, la combinación de diferentes sustancias es un campo muy amplio a explorar. El objetivo final de las combinaciones es el de poder juntar los beneficios y las propiedades de las sustancias en una nueva

y mejor formulación. En el caso de las saponinas del ginseng, los efectos sinérgicos de la combinación con hidróxido de aluminio están demostrados en diferentes especies.

Un trabajo realizado por Sun et al. (2008) utilizó un modelo de inmunización con ovalbúmina para valorar diferentes formulaciones de adyuvante en vacunas experimentales. Los autores com-

Estudios inmunológicos desarrollados sobre adyuvantes a base de saponinas extraídas de la raíz del ginseng han demostrado que:

- Estimulan la producción de células mononucleares periféricas (población celular clave en el punto de inoculación de una vacuna para dar una respuesta inmunológica adecuada).
- Estimulan la maduración de las células dendríticas mejorando el proceso de presentación de antígeno en el animal.





pararon formulaciones que incluían hidróxido de aluminio, Gíngenosido Rg1, y la combinación de estas dos sustancias. Caracterizaron la respuesta inmunológica (Th1 y Th2) mediante la medición de niveles del isotipo de IgG en suero, la producción de IFN γ e IL-5. Sus principales conclusiones fueron que los gíngenosidos promovían tanto la respuesta Th1 como Th2 y que esa combinación de gíngenosidos y aluminio regulaba la respuesta Th1/Th2 obteniendo así una protección mejorada.

Rivera et al. (2003) también observó este efecto en cobayas cuando combinaba hidróxido de aluminio con gíngenosidos. Sus resultados demostraron que la combinación del ginseng y alumi-

nio potenciaba la producción de anticuerpos en comparación con vacunas que contenían estas mismas sustancias solas. Realizó posteriormente (Rivera et al, 2003b) el mismo experimento en cerdos, demostrando el mismo efecto que en los cobayas. El estudio demostró que los animales vacunados con la combinación de hidróxido de aluminio más ginseng presentaban niveles de anticuerpos (IgGs) específicos, mayores al resto de grupos. Sobre el mecanismo de acción, el estudio concluía citando la hipótesis de que dicho efecto debía ser causado por el conocido efecto "depot" del hidróxido de aluminio junto con las propiedades inmunológicas de las saponinas del ginseng.

Bibliografía

- **Garlapati S., M. Facci, M. Polewicz, S. Strom, L.A. Babiuk, G. Mutwiri, R.E. Hancock, M.R. Elliott, and V. Gerdt.** Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008.
- **Iwasaki, A. and R. Medzhitov.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987-995. 2004.
- **Joo SS; Won TJ; Kim MS; Lee DI.** Hematopoietic effect of ginsenoside Rg3 in ICR mouse primary cultures and its application to a biological response modifier. *Fitoterapia* 2004.
- **Kenarova et al.** Immunomodulating Activity of Ginsenoside Rg1 from Panax Ginseng. 1990.
- **Kim KH; Lee YS; Jung IS; Park SY; Chung HY; Lee IR; Yun YS.** Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Med.* 1998.
- **Larsen, M.W., C. Moser, N. Hoiby, Z. Song, and A. Kharazmi.** Ginseng modulates the immune response by induction of interleukin-12 production. *APMIS.* 112:369-373. 2004.
- **Lee, E.J., E. Ko, J. Lee, S. Rho, S. Ko, M.K. Shin, B.I. Min, M.C. Hong, S.Y. Kim, and H. Bae.** Ginsenoside Rg1 enhances CD4(+) T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation. *Int Immunopharmacol.* 4:235-244. 2004.
- **Liou, C.J., M.L. Li, and J. Tseng.** Intraperitoneal injection of ginseng extract enhances both immunoglobulin and cytokine production in mice. *Am. J. Chin Med.* 32:75-88. 2004.
- **Mazzoni, A. and D.M. Segal.** Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* 75:721-730. 2004.
- **Nakaya TA; Kita M; Kuriyama H; Iwakura Y; Imanishi J.** "Panax ginseng induces production of proinflammatory cytokines via toll like receptor". *J Interferon Cytokine Res.* 2004
- **Oh GS; Pae HO; Choi BM; Seo EA; Kim DH; Shin MK; Kim JD; Kim JB; Chung HT.** 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer Letters.* 2004
- **Riedel, S.** Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.).* 18:21-25. 2005.
- **Rivera, E., A. Daggfeldt, and S. Hu.** Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and Erysipelothrix rhusiopathiae. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91:19-27. 2003.
- **Rivera, E., S. Hu, and C. Concha.** Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants. *Vaccine.* 21:1149-1157. 2003.
- **Rivera, E., P.F. Ekholm, M. Inganas, S. Paulie, and K.O. Gronvik.** The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. *Vaccine.* 23:5411-5419. 2005.
- **Scaglione F; Cattaneo G; Alessandria M; Cogo R.** Efficacy and safety of the standardised Ginseng extract G15 for potentiating vaccination against the influenza syndrome and protection against the common cold. *Drugs Exp Clin Res.* 1996.
- **Schijns, V.** Activation and programming of adaptive immune responses by vaccine adjuvants. *Veterinary Sciences Tomorrow.* 3: 1-7. 2001.
- **Sun et al.** Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of Panax notoginseng. *Vaccine.* 2005
- **Sun, J., S. Hu, and X. Song.** Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine.* 25:1114-1120. 2007.
- **Sun, J., X. Song, and S. Hu.** Ginsenoside Rg1 and aluminium hydroxide synergistically promote immune responses to ovalbumin in BALB/c mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:303-307. 2008(a).
- **Sun, Y., H. Tong, M. Li, Y. Li, S. Guan, and J. Liu.** Immunological adjuvant effect of Japanese ginseng saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. *Vaccine.* 2008(b).
- **Werling, D. and T.W. Jungi.** TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91:1-12. 2003.
- **Yu, J.L., D.Q. Dou, X.H. Chen, H.Z. Yang, N. Guo, and G.F. Cheng.** Immunoenhancing activity of protopanaxatriol-type ginsenoside-F3 in murine spleen cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 25:1671-1676. 2004.