

# ADYUVANTES OLEOSOS:

DEFINICIÓN, CARACTERÍSTICAS, TIPOS DE RESPUESTA INMUNE QUE ENGENDRAN, REACCIONES ADVERSAS

Bernagozzi Jorge A. (1); Barragán Javier H. (2).

1.- Profesor Adjunto Ordinario Cátedra Inmunología Veterinaria.

Profesor Titular Interino Cátedra Inmunología II Parte. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

2.- Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra Inmunología II Parte. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Correspondencia autor: Bernagozzi Jorge: E-mail: jorgeberna22@gmail.com

## RESUMEN

Los adyuvantes son compuestos que se agregan a las vacunas, principalmente a aquellas inactivas o muertas, con el objeto de mejorar la respuesta inmune a un determinado inmunógeno, dirigir el tipo de respuesta y aumentar la duración de la misma.

Etimológicamente la palabra adyuvante deriva del latín *adyuvare* que significa ayudar.

Desde hace casi un siglo que los investigadores desarrollan diferentes fórmulas utilizando compuestos totalmente disímiles con el mismo objetivo.

Las vacunas muy purificadas necesitan inexorablemente la adición de sustancias adyuvantes, dado que por su extrema pureza poseen una limitada capacidad de impacto sobre el sistema inmune.

Los adyuvantes oleosos constituyen sin duda un capítulo aparte dentro de los mismos.

Los descubrimientos realizados en el epílogo del siglo pasado por Charles Janeway y Polly Matzinger sobre el mecanismo de reconocimiento de agresiones por parte de los vertebrados superiores permitieron conocer con mayor precisión el mecanismo de acción de los adyuvantes.

## PALABRAS CLAVE:

adyuvante, emulsión, respuesta inmune

## ABREVIATURAS:

DPT: vacuna triple Antidiftérica, Antitetánica, Anticoqueluchosa. INF- $\gamma$ : Interferón gamma; GM-CSF: Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos; AFC. Adyuvante de Freund Completo; AF: Adyuvante de Freund Incompleto. LPS: lipopolisacáridos; MDP: Muramil Di Péptido; W/O: agua en aceite; O/W aceite en agua; W/O/W: agua en aceite en agua; SDS: dodecil sulfato sódico o lauril sulfato sódico; PRR's: Receptores de Reconocimiento de Patrones; TLR: Receptores Semejantes a los Toll; CD4+: linfocito T CD4 activado; CD8: linfocito T citotóxico; IMC: Inmunidad Mediada por Células; IL: Interleuquina.

## HISTORIA

La historia de los adyuvantes está relacionada en forma indirecta con el descubrimiento realizado por Emil Von Bering y Shibasaburo Kitasato en el año 1890, quienes demuestran la actividad antitóxica del suero de enfermos que superaron la difteria.

En 1923, Ramon<sup>1</sup> logra transformar las toxinas en toxoides mediante el agregado de formol y manteniendo el producto a 37°C durante cierto tiempo.

El mismo Ramón, en el año 1925, avisa la posibilidad de producir anticuerpos antidiftéricos y antitetánicos en equinos para su uso profiláctico y terapéutico. Inocula los mismos con cantidades variables de toxoide y con el objeto de promover una mayor respuesta inmu-

ne adiciona al antígeno específico diversas sustancias, como migas de pan, tapioca, agar, sales metálicas, lecitina y saponina.

Alexander T. Glenny, en el año 1926, observa que los equinos inoculados con toxina diftérica que presentaban una profusa inflamación en el sitio de inoculación desarrollaban títulos más altos de anticuerpos que aquellos animales menos reactivos localmente.<sup>2</sup>

Glenny comienza a testar una serie de compuestos químicos en cuyas composiciones se encontraba el aluminio y descubre las propiedades adyuvantes de estas sales. Así comienza la utilización en forma totalmente empírica de un adyuvante que haría historia en los siguientes 90 años dado el excelente balance que presenta entre el incremento de la respuesta inmune y la tolerancia por el organismo.<sup>2</sup>

Glenny denominó a estas sustancias con el nombre genérico de "adyuvantes de aluminio"<sup>2</sup>

En 1930, se demuestra que ciertos inmunógenos bacterianos, como los de Bordetella pertussis, tienen propiedades adyuvantes cuando entran en la composición de una determinada vacuna y generan un aumento de la inmunogenicidad de los otros componentes. Nace aquí el concepto de adyuvancia intrínseca, denominación que se aplica a todo inmunógeno que, además de generar una respuesta inmune per se, potencia a otros que componen la formulación de la vacuna, ejemplo vacuna DPT.

De acuerdo a estos conceptos, podemos clasificar los adyuvantes en:

**Adyuvantes extrínsecos:** aquellas sustancias que no tienen propiedades inmunogénicas per se, como aluminio, emulsiones, inulina, saponina.

**Adyuvantes intrínsecos:** aquellas sustancias que, además de ser inmunogénicas, exaltan la respuesta inmune a los otros componentes de la vacuna.

Cox y Coulter en 1997 clasifican los adyuvantes, desde otro punto de vista, como particulados y no particulados.<sup>3</sup>

Audibert y Lise en 1993 identifican y dividen los adyuvantes en al menos, tres tipos: particulados, no particulados, y agregan como capítulo aparte, sustancias vegetales, como aceites, saponinas y derivados de la misma, extracto de glucanos, estructuras de la pared bacteriana como monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa, toxina colérica, sustancias químicas como el hidróxido de aluminio, surfactantes, emulsiones, micro y nanopartículas.<sup>4</sup>

Con posterioridad, fue agregado un cuarto grupo,

compuesto por citoquinas como INF- $\gamma$  o el GM-CSF, como asimismo hormonas del grupo de la Dihidroxiandrosterona (DHEA).

La primera emulsión fue descrita por Le Moinic en el año 19165. Sin embargo, fue Jules Freund el primero en desarrollarlas, en el año 1936, adicionando Mycobacterium tuberculosis inactivado que originaba buenas respuestas inmunes pero importantes reacciones adversas además de una sensibilización específica hacia el bacilo tuberculoso. Nace el AFC. Suele utilizarse en planes de hiperinmunización como primera y única aplicación.<sup>6</sup>

Stuart-Harris, en el año 1969, eliminan de la formulación al Mycobacterium, denominándolo AFI.<sup>7</sup>

Las primeras emulsiones resultaban algo inestables y se fueron perfeccionando con la utilización de nuevos surfactantes más eficaces y puros.

La bibliografía menciona otras experiencias realizadas con adyuvantes oleosos como las llevadas a cabo por Hemle y col., en el año 1944, en el desarrollo de una vacuna contra influenza, mientras que Jonas Salk utiliza adyuvantes oleosos en vacunación a soldados en 1951.<sup>8,9</sup>

Desde entonces a la actualidad, se han desarrollado un sinnúmero de adyuvantes como LPS, componentes de la pared bacteriana, MDP, inulina, nano partículas con el objeto de obtener vacunas seguras, lograr una inmunidad duradera, y sobre todo la posibilidad de inducir cross priming, es decir presentación cruzada de antígenos con el fin, de engendrar, no solo anticuerpos sino además inmunidad celular con microorganismos inactivos, fracciones o componentes de los mismos producidos a través de la ingeniería genética.

## **En general la adición de sustancias adyuvantes**

### **tiene los siguientes objetivos:**

- 1.- Promover la eficacia de la vacunación
- 2.- Evitar la repetición de inmunizaciones
- 3.- Reducir las dosis de inmunógeno
- 4.- Obtener respuestas inmunes selectivas
- 5.- Generar células de memoria de larga vida
- 6.- Favorecer la migración de estas células a sus lugares específicos de acción
- 7.- Engendrar respuestas inmunes contra epitopes purificados que por sí solos no serían capaces de hacerlo o bien generarían una pobre respuesta de corta duración



## QUÉ ES UNA EMULSIÓN.

Cuando agitamos dos líquidos no miscibles, por ejemplo agua y aceite, se forman pequeñas gotas que se dispersan unas dentro de las otras. Cuando se suspende la agitación y quedan estáticas, se vuelven a diferenciar perfectamente las dos fases originales.

Se define como emulsión a la dispersión de un líquido, denominado fase dispersa, dentro de otra fase líquida, denominada fase continua, debiendo permanecer estable. Estas fases no son miscibles naturalmente. Figura 1.

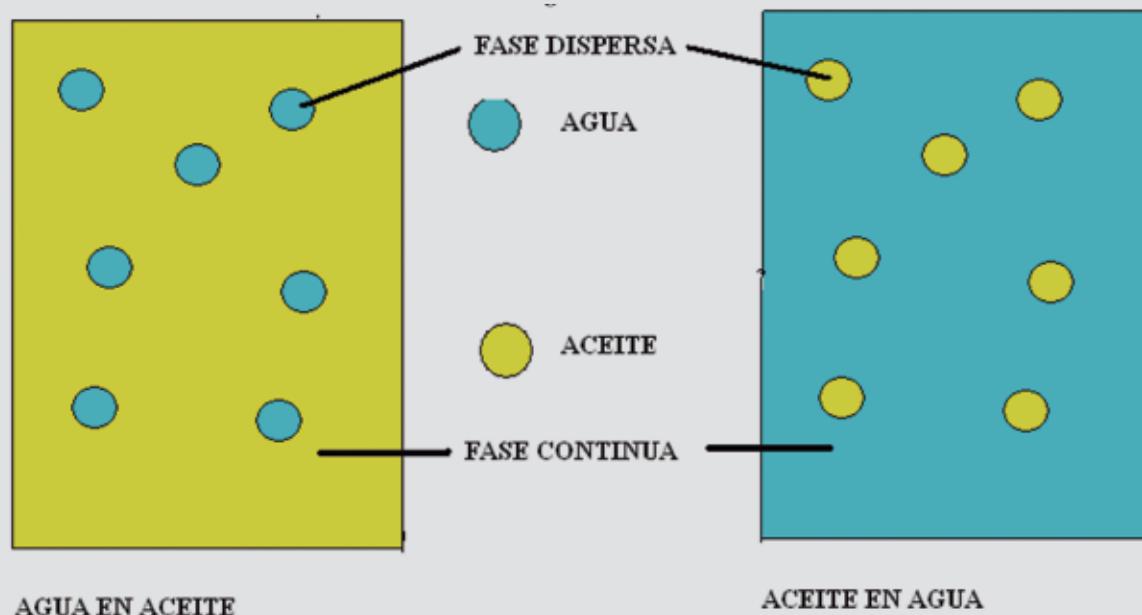


Figura 1.- Fases de una emulsión.

En la formulación de las vacunas con adyuvantes oleosos, estas fases son la acuosa, donde se encuentra incluido el inmunógeno, y la segunda es un aceite. Las emulsiones deben ser estables y a tales efectos se debe adicionar un estabilizante de las mismas, denominado surfactante.

### **Básicamente, las emulsiones las podemos dividir en dos tipos:**

- Cuando las gotas de agua o solución acuosa, denominada fase dispersa, se encuentra inmersa en otra fase compuesta por aceite, que se denominada fase continua, nos encontramos en presencia de una emulsión denominada agua en aceite o w/o (water in oil) por su sigla en inglés, denominación que utilizaremos en el presente artículo, ya que se presta a menor confusión.
- Cuando la fase dispersa es aceite y la fase continua es agua la emulsión se denomina aceite en agua o O/W. Para evitar que al suspender la agitación las fases se

separen, se hace necesaria la adición de un compuesto que tenga la capacidad de estabilizarlas. Estos compuestos se denominan surfactantes, nombre derivado del inglés surface active agent (por contracción: surfactante), es decir, activo en la superficie.

El surfactante es un componente que contiene un grupo polar hidrofílico y un grupo no polar hidrofóbico, formado generalmente por cadenas grasas.

El surfactante se ubica sobre la superficie de las gotas y evita o retarda la coalescencia de las mismas, manteniendo estable la emulsión. Figura 2.

El término estable es relativo, ya que una emulsión no es termodinámicamente estable, dado que después de cierto tiempo, dependiendo del sistema utilizado, se separa.

Las sustancias surfactantes se clasifican de acuerdo al Balance Hidrofílico/Lipofílico llamado por la sigla en inglés HLB. Este valor determina la afinidad mayor o menor hacia una de las fases. De acuerdo al valor del



balance, pueden realizarse distintos tipos de emulsiones.<sup>10</sup>

de emulsiones.

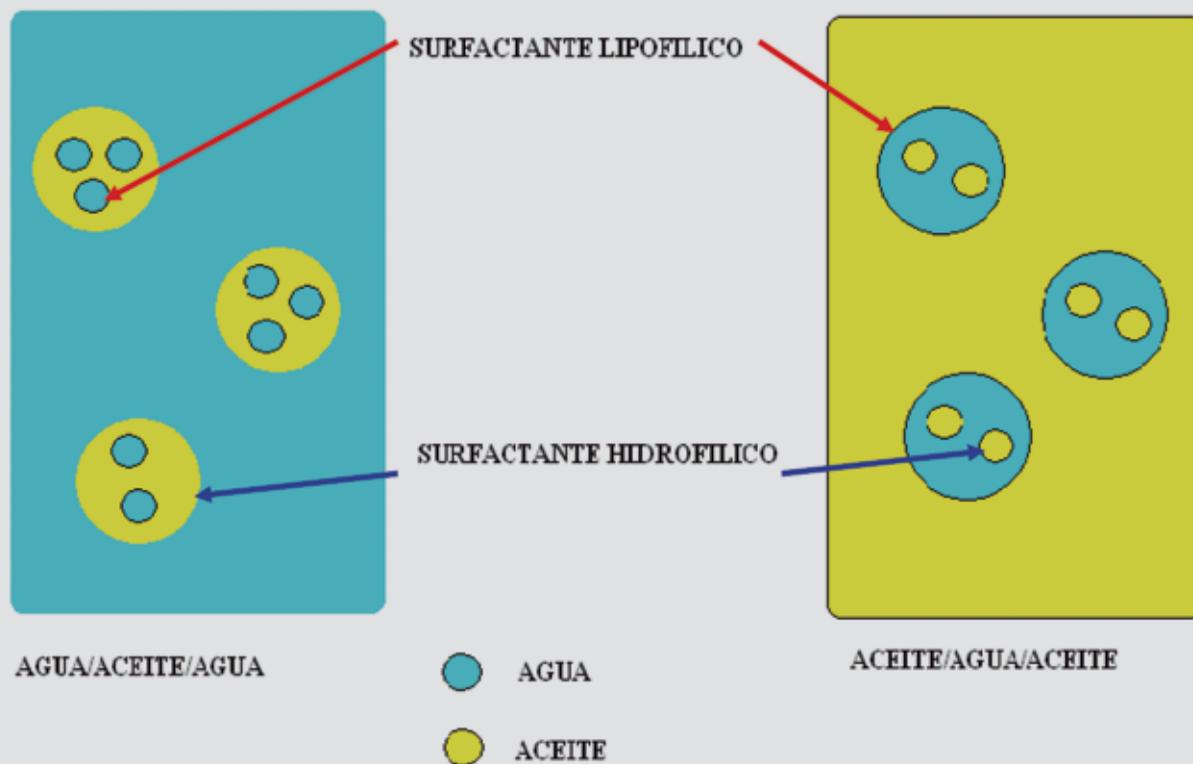


Figura 2.- Sitio de acción de los surfactantes

Los surfactantes que poseen un bajo valor de HLB tienen gran afinidad por las fases oleosas y serán aptos para elaborar emulsiones de agua en aceite (W/O).

Aquellos que poseen un alto valor de HLB tienen gran afinidad por la fase acuosa y son los adecuados para realizar emulsiones aceite en agua (O/W).

Los que tienen un valor HLB intermedio son aptos para elaborar doble emulsión agua en aceite en agua (W/O/W). Este tipo de emulsiones se caracteriza porque la fase continua es agua y la dispersa es aceite, pero dentro del aceite se encuentra atrapada agua.

## DOBLE EMULSIÓN

El proceso de elaboración de la doble emulsión es mucho más complejo. Fueron diseñadas por Herbert<sup>11</sup> y las mismas se realizaban en dos etapas, lo que hace muy dificultoso el proceso. Actualmente, existen procedimientos industriales que realizan la misma en un

solo paso.

Las más utilizadas son las de agua/aceite/agua. La importancia de este tipo de emulsión es su baja viscosidad y el hecho de tener disponible en la fase acuosa externa antígeno que es procesado rápidamente para, luego, en la fase acuosa interna, entregar una nueva porción de antígeno, no necesariamente del mismo tipo y concentración al de la fase externa. La liberación de la fase acuosa interna es similar a lo que acontece en la emulsión simple.

El problema de estas emulsiones, además de lo complejo de su elaboración, es que poseen, en general, baja estabilidad. En su fabricación, se utiliza una gran variedad de componentes y con una determinada secuencia. Una formulación común puede contener agua ultra pura, un surfactante hidrofílico, SDS, un surfactante lipofílico, Span o Tween 80 y dodecano. En un primer paso, se fabrica una emulsión W/O utilizando solución de cloruro de sodio, dodecano y Tween 80. Luego, se dispersa esta emulsión en una solución acuosa de SDS

y produce una emulsión O/W que luego es dispersada en SDS y así se logra la doble emulsión.

### FACTORES QUE CONDICIONAN LA EFECTIVIDAD DE LA EMULSION

La calidad intrínseca de la emulsión condiciona la eficacia y la seguridad del adyuvante.

Esto significa que la calidad del mismo subordina la eficiencia de la respuesta inmune y la aparición o no de reacciones indeseables.

Hay varios parámetros que el laboratorio elaborador debe respetar y controlar previo al lanzamiento al mercado.

1.- Test de la gota: se deja caer una gota de la vacuna en un vaso de precipitado que contenga agua y si estamos evaluando una emulsión w/o, la más usada en Medicina Veterinaria, debe permanecer en la superficie y sin desarmarse. Si fuera o/w se esparce por el líquido.

2.- La conductividad debe ser menor a  $3\mu\text{S}$  (micro Siemens), preferentemente inferior a  $1\mu\text{S}$ . Depende mucho del tipo y concentración del surfactante utilizado.

3.- La viscosidad depende de varios factores: tipo de surfactante, relación agua/aceite, tiempo de emulsificación. Pueden variar desde 20 mPa s a 200 mPa s (mili Pascal segundo, unidad dinámica), las más viscosas.<sup>12</sup>

A mayor viscosidad, mayor inconveniente en la inoculación.

La estabilidad es una característica importante y fundamental. Las emulsiones que se encuentran separadas, aunque al agitarlas se homogenicen, no funcionan correctamente.

Las emulsiones más estables son aquellas realizadas con partículas pequeñas, distribuidas homogéneamente y utilizando un surfactante adecuado.

Un factor a tener en cuenta al preparar emulsiones es la carga proteica del antígeno que se incorpora a la fase acuosa. Puede contener proteínas con propiedades surfactantes, ya que las mismas son anfóteras, con grupos polares que modifican el HLB. Es necesario ajustar o modificar el surfactante a utilizar para optimizar la emulsión.

La estabilidad no es permanente, ya que con el transcurrir del tiempo, inexorablemente la emulsión se separará. No obstante ello, debe permanecer inalterable durante todo el período de validez que la vacuna posea.

A  $4^{\circ}\text{C}$ , debe, al menos, perdurar por 2 años. A temperatura ambiente, la misma emulsión puede perder la estabilidad después de 6 meses, mientras que, a  $37^{\circ}\text{C}$ , variará desde varias semanas a 2 o 3 meses. Esta prue-

ba se utiliza en los laboratorios productores para predecir el funcionamiento de la misma. Por lo tanto, es muy importante la temperatura de almacenamiento que le dispensemos a estas vacunas.<sup>13</sup>

La estabilidad depende, además, del tipo de aceite utilizado (mineral, vegetal, animal, sintéticos) y si son utilizados puros o en mezclas. Cada aceite requiere de un surfactante distinto y adecuado. Los aceites vegetales (maíz, girasol, maní) generan menor inmunidad, ya que son fagocitados más rápidamente que los minerales o sintéticos.

### SEGURIDAD Y REACCIONES ADVERSAS.

Todos los adyuvantes oleosos se caracterizan por inducir reacciones locales inflamatorias, abscesos importantes y granulomas de diversos tamaños, incluso de varios kilos de peso, que ocasionan daño en las reses y pérdidas económicas importantes por afectar la calidad de la pieza. En general, los aceites vegetales son menos reactogénicos pero, a su vez, menos inmunogénicos.<sup>14,15,16</sup>

Los minerales permanecen mayor tiempo en el sitio de inoculación, siendo procesados y metabolizados por los macrófagos, transformándolos en ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos o esteroides<sup>17</sup>. Bollinger y col. encontraron que el 30% de los aceites minerales desaparece del sitio de inoculación durante el primer mes, encontrándose el aceite en el hígado y tejidos grasos en forma de fosfolípidos y ácidos grasos.<sup>18</sup>

Stewart-Tull y col. en 1976 demostraron la incidencia del largo de la cadena de carbonos en la formación de reacciones adversas. Los ácidos grasos con cadenas cortas son muy eficientes pero inducen fuerte reacción local, mientras que los de largas cadenas, mayores a 14 carbonos, son seguros pero menos inmunogénicos.<sup>19</sup>

Es muy importante el nivel residual de ácidos grasos libres presentes en los surfactantes utilizados.

El antígeno también tiene mucha importancia. Las bacterias enteras o no purificadas sobre todo si contienen mucho LPS, son más reactogénicas, mientras que los antígenos de origen viral causan menos reacciones adversas.<sup>20</sup>

Otras variables que condicionan la reactogenicidad son la concentración antigénica y la dosis a aplicar.



## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA UTILIZACION DE ADYUVANTES OLEOSOS.

No existe el adyuvante ideal. Cada situación, cada antígeno, cada objetivo, amerita un estudio detallado del tipo de adyuvante a utilizar.

En general, el mecanismo de acción de los adyuvantes, en muchos casos, no está total y claramente establecido. Se caracterizan por producir un foco flogístico donde acuden células específicas responsables de engendrar la respuesta inmune, retardo de la eliminación del antígeno y, por lo tanto, mayor permanencia y mayor efecto estimulador, liberación lenta, modificación del estado físico del antígeno, cambios a nivel de las cargas eléctricas del inmunógeno, entre otras.

Los adyuvantes oleosos, también clasificados como dispersables, generan excelentes respuestas inmunes pero, como contrapartida, los mayores efectos indeseables, como los granulomas.

El primer mecanismo de acción es el efecto de depósito (depot) del antígeno y un proceso inflamatorio importante.

Lo segundo que hay que tener en cuenta es la cinética de liberación del antígeno que no es igual para las diferentes emulsiones (w/o, o/w o w/o/w).

Cuando se inocula un inmunógeno sin adyuvantes se produce una rápida diseminación del antígeno a través de la linfa y sangre, casi en forma inmediata.

Sin embargo, los antígenos emulsionados sufren distintos retardos en la liberación, dependiendo, fundamentalmente, del tipo de emulsión. Así, la emulsión O/W denota un ligero retraso pero la liberación de la proteína se produce muy rápidamente. Por el contrario, la emulsión W/O, la más comúnmente utilizada en Medicina Veterinaria, se caracteriza por producir una liberación muy lenta del mismo. Pero esta liberación lenta está supeditada a la estabilidad de la misma y la ruptura o la mala calidad de la emulsión determinan una rápida difusión. De ahí la importancia, como hemos referidos unos párrafos más arriba, de no utilizar emulsiones que se encuentran separadas por más que se unifiquen las fases al agitarlas.

Las emulsiones dobles W/O/W tienen comportamientos intermedios y muy particulares. Podemos decir que poseen un mecanismo doble: por un lado, el antígeno comprendido dentro de la fase acuosa externa se libera prontamente, permitiendo inducir una respuesta

inmune rápida, mientras que el antígeno comprendido dentro de la fase acuosa interna es liberado con posterioridad, y engendrar una respuesta inmune muy duradera. Este tipo de emulsión es muy utilizado en la especie porcina.

El efecto depot, si bien es muy importante, no es una condición limitante. Se ha demostrado en vacunas adyuvadas con Freund incompleto que si se eliminaba quirúrgicamente el inmunógeno depositado en el sitio de la inoculación no se pierde totalmente el efecto adyuvante.<sup>21</sup> Esto está condicionado por la dispensabilidad del adyuvante hacia los linfonodos.

La inclusión del inmunógeno dentro de las vesículas del adyuvante protege al mismo de la degradación enzimática que sufren las proteínas, modificando, además, la carga eléctrica, lo que aumenta la antigenicidad.<sup>22</sup>

Como hemos expresado, si bien la inflamación no es una condición esencial para mejorar la respuesta inmune, la acumulación en el fenómeno flogístico de células específicas presentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, facilitan la toma del antígeno, quizás no sólo por contigüidad, sino por interacción del surfactante con la membrana lipídica de las mismas.<sup>23</sup>

Estos adyuvantes promueven la afluencia y permanencia de linfocitos en la zona de aplicación y la acumulación de los mismos en los nódulos linfáticos por alterar la recirculación de los mismos a través de la producción de quimioquinas que originan proliferación de moléculas de adhesión que adhieren células blancas.<sup>24</sup>

El tipo de emulsión utilizada también condiciona la inducción de citoquinas que favorecen las respuestas inmunes específicas y pueden condicionar el tipo de respuesta de inmunoglobulinas (diversos tipos o subtipos) y/o células T sensibilizadas.<sup>25</sup>

## TIPOS DE RESPUESTA INMUNE ENGENDRADA POR LOS ADYUVANTES OLEOSOS.

El tipo de respuesta engendrada por los adyuvantes oleosos comúnmente utilizados en Medicina Veterinaria no está totalmente establecida.

En general, debemos mencionar que la principal respuesta inmune es de tipo humoral, mediada por anticuerpos circulantes, ya que la incorporación de inmunógenos al citosol celular por los adyuvantes oleosos

clásicos es poco probable que logre inducir inmunidad mediada por células.

Debemos recordar que la respuesta mediada por anticuerpos esta asociada al procesamiento y presentación del inmunógeno por la vía exógena asociado al complejo de histocompatibilidad de tipo II, donde es reconocido por linfocitos T CD4+, colaboradores del linfocito B, en la producción de inmunoglobulinas.

La respuesta mediada por efectores de la inmunidad mediada por células (LT CD8+ citotóxico, CD4+ y macrófagos activados) está condicionada, fundamentalmente, al mecanismo de presentación por vía endógena a través del procesamiento en el citosol celular por el proteasoma.<sup>26</sup> Por esta vía se procesan proteínas nativas de la células alteradas, degradadas o bien proteínas de agentes infecciosos que ingresaron al citosol a través de receptores específicos presentes en la membrana celular. Otra posibilidad es la denominada cross presentación o presentación cruzada, donde el inmunógeno ingresa por la vía exógena en estado biológico activo y, a través de diversos mecanismos, sale del sistema vesicular y cae al citosol, donde son procesados por la vía endógena. En general la cross presentación está asociada a la virulencia y a ciertos factores de patogenicidad presentes en los microorganismos activos, mientras que las sustancias inactivas (toxoides, microorganismos inactivos) prácticamente son incapaces de abandonar la vía exógena, aunque, en ciertas oportunidades, pueden hacerlo pero en mucha menor escala.

Ciertos adyuvantes, como el Iscom's o los liposomas tienen la particularidad de introducir inmunógenos directamente al citosol y, por ende, pueden inducir una inmunidad mediada por células robusta.

Hace poco tiempo, se ha demostrado que ciertos adyuvantes oleosos con capacidad de estimular ciertos PRR's, fundamentalmente los TLR 4,<sup>27</sup> pueden provocar, a través de la inducción de ciertas señales específicas, cross presentación aún de antígenos inactivos, o bien permitir que en los endosomas se encuentren CMH I para asociar los epitopes secuenciales procesados, expresarlos sobre las membranas celulares y promover inmunidad mediada por células. También, últimamente, se han ensayado vacunas en adyuvantes oleosos adicionados de sílice finamente dividido que, aplicado por vía transdermal, poseen capacidad de inducir IMC.<sup>28</sup>

Estudios recientes mencionan que animales que han

recibido la vacuna contra fiebre aftosa con adyuvante de doble emulsión presentan linfocitos T CD8+ sensibilizados al virus, demostrado in vitro por la liberación de INF- $\gamma$  cuando se exponen los LT al virus aftoso.<sup>29,30,31</sup> Como en la vacuna antiaftosa los Ac neutralizantes son los responsables de la protección de la enfermedad, no se ha estudiado la acción de los LT CD8+ in vivo.<sup>32,31,33</sup>

Sin embargo, cuando hemos consultado a los autores del trabajo sobre qué sucede en otros tipos de vacunas (IBR, DVB), manifiestan no poseer información cierta.

Guzmán y col., en sus trabajos sobre fiebre aftosa, también demuestran la presencia de CD8+ in vitro por análisis de producción de INF- $\gamma$ .<sup>34</sup>

Actualmente, se está investigando el uso combinado de sales de aluminio con Quil A que tendrían la capacidad de inducir inmunidad mediada por células. Quil-A es un extracto semi-purificado de la fracción saponinada de la corteza del árbol de América del Sur, Quillaja saponaria Molina.

Por todo lo expuesto, creemos que más allá de que no se puede negar la existencia de linfocitos TCD8 sensibilizados, no hay pruebas fehacientes de que los adyuvantes oleosos comunes sean capaces de inducir una fuerte respuesta celular con ingerencia sobre la prevención o curación de la enfermedad. No obstante ello, las nuevas formulaciones que en el futuro podrán aplicarse en Medicina Veterinaria abren un interesante camino.

#### **EMULSIONES MÁS COMUNES DE USO EN MEDICINA VETERINARIA.**

Emulsión agua en aceite W/O. Recomendada para bovinos, ovejas, aves, y también utilizada en peces de criaderos por su capacidad de inducir una larga inmunidad. Un ejemplo típico es la vacuna contra fiebre aftosa con una sola dosis de aplicación anual en vacas que han sido vacunadas con anterioridad y dos inoculaciones para primo vacunación o en las bubalinas. Aquí se nota una ventaja importante con respecto a la vacuna adyuvada con hidróxido de aluminio, que exigía más de dos vacunaciones al año. Este hecho justifica las reacciones más exacerbadas producidas por el adyuvante oleoso con relación a las sales de aluminio. En aves, los adyuvantes oleosos permiten, en algunos casos, una reducción de la cantidad de antígeno en la formulación. Existen también otras vacunas como la del complejo respiratorio bovino o para enfermedades reproductivas que utilizan adyuvantes oleosos que,



en general, engendran una respuesta inmune mediada por anticuerpos circulantes cuya persistencia, en la mayoría de los casos, es inferior al año. No hay mayor información sobre respuesta celular engendrada y su utilidad en la prevención.

Doble emulsión agua en aceite en agua W/O/W. Si bien su elaboración es compleja tienen ciertas ventajas como su baja viscosidad, buena tolerancia y capacidad de engendrar una respuesta duradera. Son muy empleadas en la especie porcina. Se han desarrollado experiencias que demuestran que la vacuna aftosa doble emulsión en cerdos permite obtener respuesta inmune importante a los 4 días post inoculación, 33 muy utilizadas en casos de ruptura de inmunidad. Se han probado exitosamente en bovinos en la vacunación contra Pasteurellosis. También se sospecha que son capaces de inducir liberación de IL-6.<sup>35</sup>

Emulsión Aceite en agua. Son muy fluidas, bien toleradas pero dan una inmunidad muy corta. En general, se las utiliza en cerdos gordos o engrasados.

Emulsiones con el agregado de nanopartículas. Las vacunas con nanopartículas de entre 10 y 500 nm constituyen una opción futura importante. Fueron probadas en cerdos en vacunas contra rinitis atrofica y pleuro-neumonía, patología con mucha incidencia en la producción porcina, con importante respuesta inmune y sin reacciones adversas importantes.<sup>35,36</sup>

Actualmente, se está ensayando una vacuna en la especie bovina contra anaplasmosis.<sup>37</sup>

La posibilidad de combinar nanopartículas con adyuvantes oleosos permite inducir cross presentación con una importante respuesta inmune celular.

## CONCLUSIÓN.

No existen adyuvantes ideales. La elección depende del tipo de antígeno, de la respuesta inmune a inducir y de las especies a las cuales se va a aplicar. La vía de aplicación tiene suma importancia en el tipo y duración de la respuesta inmune. Otro parámetro importante es evaluar el costo/beneficio entre la respuesta inmune/reacciones adversas, debiéndose evaluar, según el tipo, raza o la actividad que desarrolla el animal a vacunar.

Es importante utilizar emulsiones estables que no se hallen separadas y recordar que, hasta que no se demuestre fehacientemente lo contrario, la principal respuesta es humoral con las emulsiones comunes, si bien se pueden detectar in vitro la presencia de CD8+ sensibilizados por técnicas de producción de INF- $\gamma$  o captación de timidina tritada. Sin embargo, la presencia de células activas y su funcionalidad in vivo no está totalmente establecida.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Ramon G. Sur** l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthérique. Bull. Soc. Centr. Med. Vet 1925; 101:227.
- 2.- **Glenny A., T, Pope C., G, Waddington H., Wallace U.** Immunological Notes: XVII-XXIV. J Pathol Bacteriol. 1926;29:31-40.
- 3.- **Cox J, Coulter A.** Adjuvants: a classification and review of their modes of action. Vaccine 1997; 15 (3): 248-256.
- 4.- **Audibert F. M., Lise L. D.** Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Trend Pharmacol. Sci. 1993. 14:174-178.
- 5.- **Le Moinic, Pinoy.** Les vaccins en emulsion dans les corps gras ou lipovaccins. Compt. Rend. Soc. Biol. 1916.
- 6.- **Freund Jules, Casals J., Elizabeth Page Hosmer.** Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. 1937. Collected Papers by Members of the staff. Vol. 14. Part 1. Rockefeller Foundation International Health Division.
- 7.- **Stuart-Harris, C., M.** Adjuvants influenza vaccines. 1969. Bull World Health Org. 41- 617-621.
- 8.- **Hemle W., Hemle G.** Effect of adjuvants on vaccination of human beings against influenza. 1945. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59. 179-181.

- 9.- **Salk J., E., Laurent A. M., Bailey M. L.** 1951. Amer. J Publ. Hlth. 41. 669.
- 10.- **Becher P. Emulsion:** Theory and practice, 2nd. New York: Reinhold, 1965.
- 11.- **Herbert W. J.** Multiple emulsions: a new form of mineral oil antigen adjuvants. Lancet 1965; 2: 71.
- 12.- **Salager, J. L.** Formulations concepts for the emulsion maker. In: Nielloud F, Mestres G.M, editors. Pharmaceutical Emulsions and Suspensions and Pharmaceutical. Science, vol. 105, 2009: 19-68.
- 13.- **Lissant K. J. L.** Emulsions and emulsions technology, part III. In Lissant Kenneth J., editor. Surfactant Science Series, vol 6, 1984. 206-310.
- 14.- **Woohhour A. F., Metzgar D. P., Stim, P. B., Tytell A. A., Hillman M. R.** New metabolizable immunologic adjuvant for human use: I, development and animal immune response. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1964; 116: 516-523.
- 15.- **Altman A., Dixon, F. J.** Immunomodifiers in vaccines. Adv.Vet. Sci. Comp. Med. 1989; 23: 301-341.
- 16.- **Edelman R. Vaccine** adjuvants. Rev. Infect. Dis. 1980; 2: 370-383.
- 17.- **Bollinger J. N.** Metabolic fatty of mineral oil adjuvants using <sup>14</sup>C-labeled tracers I: mineral oil. J. Pharm. Sci. 1970; 59: 1084-1088.
- 18.- **Bollinger J. N.** Metabolic fate of mineral oil adjuvants using <sup>14</sup>C-labeled tracers I: mineral oil.1970. J. Phar. Sci. 59. 1084-1088.
- 19.- **Stewart-Tull DES, Shimono T., Kotani S., Knights B.A.** Immunosuppressive effect in mycobacterial adjuvants emulsions of mineral oils containing low molecular weight hydrocarbons. 1976. 52. 118-128.
- 20.- **Takada H., Kotani S.** Muramyl dipeptide and derivatives. In: Stewart-Tull DES editor. The theory and Practical Application of Adjuvants. 1995: 171-202.
- 21.- **Freund J.** The mode of action of immunological adjuvants. Adv. Tuberc. Res. 1956; 1: 130-148.
- 22.- **Jolles P., Paraf A.** Mechanism of adjuvant activity. In: Kleinzeller A., Springer G. F., Wittman H. G., editors. In Chemical and Biological Basis of Adjuvants: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, vol. 13. Springer-Verlag, 1973: 81-104.
- 23.- **Waksman B. H.** Adjuvants and immune regulation by lymphoid cells. Springer Semin. Immunopathol. 1979; 2: 5-33.
- 24.- **Kaeberle M. L.** Function of carriers and adjuvants in induction of immune responses. In: Nervig R. M., Gough P. M., Kaeberle M. L., Whetstone C. A., editors. Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics. Iowa State University Press, 1986: 11-23.
- 25.- **Ganne V., Eloit M., Laval A., Adam M., Trouve G.** Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. Vaccine 1994; 12 (13): 1190-1196.
- 26.- **Coffman R.L., Sher A., Seder R.** Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. Immunity 33, 2010. October 29.
- 27.- **Johnson D. A.** TLR4 agonists as vaccine adjuvants: a chemist's perspective Expert Rev. Vaccines 2013; 12 (7), 711-713.
- 28.- **Baleeiro R. B., Wiesmüller K-H, Reiter Y., Baude B., Dähne L., Patzelt A., Lademann J., Barbuto J.A, Walden P.** Nanoparticulas a través de piel. Topical Vaccination with Functionalized Particles Targeting Dendritic Cells. Journal of Investigative Dermatology 2013; 133: 1933-1941.
- 29.- **Shen S. S., Yang Y. W.** Antigen delivery for cross priming via the emulsion vaccine adjuvants. Vaccine. 2012; 30:1560-1571 (SCI).



- 30.- **Guzman E., Taylor G., Charleston B., Ellis S. A.** Induction of a cross-reactive CD8(+) T cell response following foot-and-mouth disease virus vaccination. *J Virol.* 2010; Dec 84(23): 12375-84. doi: 10.1128/JVI.01545-10. Epub 2010 Sep 22.
- 31.- **Shen S-S., Yang Y-W.** Antigen delivery for cross priming via the emulsion vaccine adjuvants. *Vaccine* February 2012; volume 30, Issue 9, 21: 1560-1571
- 32.- **Carr V., Lefevre E. A., Windsor M. A., Inghese C., Gubbins S., Prentice H., Juleff N. D., Charleston B.** CD4+T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle.- *Journal of General Virology* 2013; 94: 97-107.
- 33.- **Salt J. S., Barnett P. V., Dani P., Willians L.** Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine* 1998; 16 (7): 746-754.
- 34.- **Guzman E., Taylor G., Charleston B., Ellis S. A.** Induction of a cross-reactive CD8(+) T cell response following foot-and-mouth disease virus vaccination. *J Virol.* 2010 Dec. 84(23):12375-84. doi: 0.1128/JVI.01545-10. Epub 2010 Sep 22.
- 35.- **Laval A., Ganne V., Aucouterier J., Crespeau F., Levy D.** Efficacy and safety of new adjuvanted vaccine formulations containing inactivated exotoxin antigens from *Pasteurella multocida*. *Proceedings of the 14th I.P.V.S. Congress.* (Bologna, Italy), 1996. July 7-10.
- 36.- **Laval A., Ganne V., Aucouturier J., Deville S., Levy D.** Assesment of a new adjuvant range in a model for atrophic rhinitis. *Proceedings of the 15th I.P.V.S. congress.* (Birmingham, England), 1998, July 5-9.
- 37.- **Ocampo V., Salazar J. E., Duran M., Canto G. J., Rodriguez S. D.** Clinical and humoral immune response of cattle vaccinated with an experimental inactivated *Anaplasma marginale* vaccine in 2 different adjuvants. *3rd anual conference on vaccine research* (Washington DC, USA). 2000. April-2 May.