

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume 50

Número
Number 4

Octubre-Diciembre
October-December 2003

Artículo:

Aplicación intranasal de vacunas Estado actual y perspectivas

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Aplicación intranasal de vacunas

Estado actual y perspectivas

Palabras clave: Tejido linfoide asociado a nasofaringe, vacunas, adyuvantes, vehículos, inducción de respuesta inmune en mucosa.

Key words: Nasal-Associated Lymphoid Tissue (NALT), vaccines, adjuvants, vehicles, induction of mucosal immune response

Recibido: 04/09/2003
Aceptado: 02/10/2003

Alexander Batista Duharte*

* Laboratorio de Inmunotoxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Universidad Médica de Santiago de Cuba.

Abreviaciones

CPA: célula presentadora de antígenos, ISCOMs: complejos inmunoestimulantes, LIe: linfocitos intraepiteliales, LNCs: linfonodos cervicales superficiales, LNCPs: linfonodos cervicales posteriores, TLAN: tejido linfoide asociado a nasofaringe, PP: Placas de Peyer, TC: toxina colérica, TCA: toxina colérica fracción A, TCB: toxina colérica fracción B.

Correspondencia:

Dr. Alexander Batista Duharte
Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Universidad Médica de Santiago de Cuba. Autopista Nacional km 1½, Apdo. Postal 4033. Santiago de Cuba 90400, Cuba. Tels: (53) 22-64 37 96 Fax: (53) 22-68 71 88
E-mail:mailto:a.batista@toxi.scu.sld.cu

199

Resumen

En los últimos años ha habido un avance significativo en la comprensión de los mecanismos inmunológicos involucrados en la protección en las mucosas. Particularmente se ha definido el papel del tejido linfoide asociado a la nasofaringe (TLAN) como un importante sitio inductor de respuesta inmune. Esto ha abierto grandes posibilidades al desarrollo de vacunas para ser aplicadas por esta vía, sobre todo teniendo en cuenta que ésta es una puerta de entrada de muchos gérmenes patógenos y la necesidad de buscar vías alternas más económicas, prácticas e incluso eficientes que la parenteral para las inmunizaciones. En el presente trabajo se revisa el estado actual de la temática, focalizando la atención en los mecanismos de inducción inmune, así como en las estrategias actuales para lograr una mejor transportación de los antígenos vacunales y potenciación de la respuesta inmune en los sitios inductores de la nasofaringe, mediante el uso de nuevas generaciones de vehículos y adyuvantes que están en desarrollo.

Summary

Only recently significant advances have been achieved in the understanding of the immunological mechanisms involved in the protection in the mucosal surfaces. Particularly has been defined the function of the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) as an important site for the induction of immune responses, which has opened possibilities for the development of vaccines to be applied using the intranasal route, keeping in mind that this is the door of entrance of many pathogens germs and the necessity of looking for more economic, practical and even efficient alternative ways than the parenteral for the immunizations. This review analyzes the current status of the thematic, focusing in the mechanisms of immune induction, as well as moderns strategies to obtain a better transportation of the antigens and to increase the immune responses in the nasal inductors places, using new generations of vehicles and adjuvant that are in development.

Introducción

La mucosa nasofaríngea constituye el primer sitio de contacto con innumerables gérmenes presentes en el ambiente, muchos de los cuales son potencialmente patógenos y, al colonizar las vías respiratorias altas, pueden producir alteraciones anatomopatológicas locales e incluso pueden atravesar la barrera mucoepitelial y colonizar órganos y tejidos vecinos o distantes, produciendo afecciones como: otitis, neumonías, meningoencefalitis, glomerulonefritis, endocarditis, entre otras.¹⁻⁴

A pesar de este conocimiento, en los procedimientos de inmunización tradicionalmente ha sido utilizada casi en forma exclusiva la vía parenteral para la administración de vacunas, con la cual no se logra obtener una protección totalmente efectiva en las puertas de entrada del germen patógeno. Durante los últimos años, ha habido un marcado interés en desarrollar vacunas que puedan ser aplicadas vía mucosa, lo que podría constituir la vía más efectiva de inmunización para la prevención de muchas infecciones.⁵ Hoy se reconoce que esta forma de aplicación de vacunas ha sido muy poco utilizada, por lo que en todo el mundo se están desarrollando importantes investigaciones con vistas a desentrañar los mecanismos inmunológicos celulares y humorales de inducción y efectores en mucosas; entre éstas, una de las que más interés despierta es la nasofaringe.⁶⁻¹⁰

Tejido linfoide asociado a nasofaringe (TLAN)

El estudio de los fenómenos inmunológicos que se generan en la mucosa nasofaríngea luego del enfrentamiento con antígenos ambientales estuvo restringido por mucho tiempo, quizás por la no disponibilidad de un modelo animal adecuado.¹¹ En relación con la mucosa respiratoria, sí hubo avances en la comprensión del tejido linfoide asociado a las vías respiratorias inferiores.¹²

Posteriormente, fueron descritos los agregados linfoides en la mucosa nasal de la rata, donde se identificaron linfocitos T y B estrechamente asociados con el epitelio.¹³ La demostración de la presencia en estas zonas de células M, con igual estructura y función que en las placas de Peyer y los agregados linfoides asociados a los bronquios, introdujo el concepto de tejido linfoide asociado a nasofaringe (TLAN).^{11,13-15}

En humanos, este tejido está formado por el anillo de Waldeyer, el cual está constituido por: la adenoides o tonsila nasofaríngea, las bandas linfoides faríngeas bilaterales, las tonsilas palatinas y las tonsilas linguales bilaterales. Tejidos equivalentes al anillo de Waldeyer han sido encontrados en diferentes especies animales, incluyendo roedores.^{2,3} En la rata, las estructuras linfoides del tracto nasal están localizadas bilateralmente en la entrada del conducto nasofaríngeo. Además, existen linfocitos aislados en el epitelio, denominados linfocitos intraepiteliales (LIE) y en la lámina propia.

El tipo de respuesta inmune generada por la entrada de un antígeno por vía intranasal depende, entre otras cosas, de la naturaleza del mismo. Los antígenos particulados, como virus y bacterias, son eliminados gracias a los mecanismos inespecíficos, como las secreciones mucosas, la acción de los cilios, la flora microbiana local, entre otros. Sin embargo, cuando estos mecanismos son afectados debido a infecciones o a contaminantes ambientales,¹⁶ o cuando existe una exposición repetida a antígenos, éstos se adhieren entonces a las células M, las cuales se encuentran recubriendo una buena parte del tejido linfoide y que están especializadas en la transportación selectiva de partículas antigénicas desde la luz hacia adentro, donde se encuentran las células del sistema inmune.^{15,17,18} Estas células M fueron inicialmente descritas en las placas de Peyer donde se determinó su estructura y función. Los estudios realizados en la mucosa nasofaríngea evidencian que existe similitud estructural e incluso funcional entre éstas y aquéllas.¹⁸

La superficie apical de las células M difiere de las células epiteliales en su capacidad para captar elementos particulados que entran a la mucosa, como por ejemplo, microorganismos no pertenecientes a la flora normal y partículas de polvo, entre otros. La membrana de las células M contiene el glicolípido GM1, al cual puede unirse la toxina colérica y una amplia variedad de carbohidratos de membrana presentes en microorganismos patógenos con capacidad de unión selectiva. Esta propiedad es aprovechada por muchos gérmenes para invadir las mucosas.¹⁸

Las partículas adheridas son transportadas a través de estructuras tubulares y vesiculares semejantes a endosomas en el citoplasma celular. Estos materiales endocitados se mantienen prácticamente inalterados y luego son liberados en la zona basal de estas células, donde existen invaginaciones en forma de bolsillos que permiten una estrecha interacción con las células inmunológicas que es-

tán inmediatamente por debajo. Los antígenos no particulados o solubles penetran la mucosa nasofaríngea a través de la barrera epitelial por fuera de las células M (Figura 1).²⁰

En relación con el tejido linfóide que se encuentra en contacto con la barrera epitelial, hay que diferenciar la población celular adyacente a las células M en el tejido linfóide, de la población que se localiza por fuera de esta región.

Por debajo de las células M existe una población celular que contiene linfocitos T, los cuales según estudios realizados con citometría de flujo por Hiroi y Kiyono,⁴ son en forma predominante CD4+ CD8- (aproximadamente 75% CD4+ CD8- y 23% CD4- CD8+ del total de células T CD3+). Además, 95% de estas células tienen TCR $\alpha\beta$ y el resto $\gamma\delta$. En esta región también es posible encontrar macrófagos y células foliculares dendríticas, las cuales, obviamente, desempeñan un papel esencial en la transportación y presentación an-

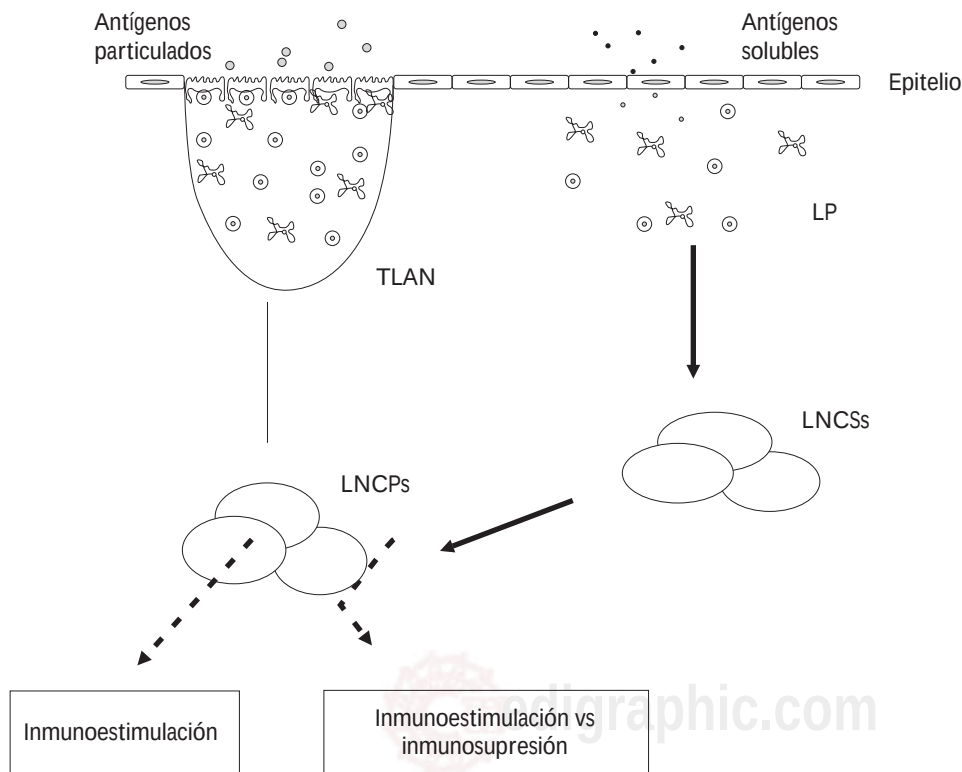


Figura 1. Representación esquemática del tejido linfóide asociado a nasofaringe (TLAN), la lámina propia (LP) y las vías de drenaje linfático de la mucosa nasal. Los antígenos particulados penetran a través de las células M presentes en el TLAN y luego son transportadas hacia los linfonodos cervicales profundos (LNCPs) desde donde se generan respuestas inmunoestimulantes. Por su parte, los antígenos solubles penetran mayoritariamente atravesando la barrera epitelial, siendo captados por las células presentadoras de antígenos en la lámina propia que las transportan hacia los linfonodos cervicales superficiales, donde se generan respuestas inmunoestimulantes (LNCSs) o supresoras

tigénica a las células T, probablemente en los linfonodos regionales como se verá más adelante.

De igual modo, en este sitio, es posible encontrar células T con un perfil de citoquinas que incluye IFN γ e IL-4 y, en menor proporción, células que secretan IL-4 o IL-6, según se demostró por análisis de ARNm, utilizando RT-PCR. Estos hallazgos sugieren que en el TLAN existe un ambiente Th0 predominante, el cual deriva a Th1 o Th2 luego de estímulos antigénicos apropiados.⁴ El microambiente existente en esta región, con la presencia de células presentadoras de antígenos, células T predominantemente auxiliaadoras (CD4+) y con un perfil de citoquinas predominante que las asocian con un patrón Th0, refuerzan el criterio de que el TLAN es un sitio inductor de respuesta inmune.

Por fuera de esta región, es decir, en la lámina propia, existe una población celular donde predominan linfocitos recirculantes y que han sido previamente activados en otros sitios o en el propio TLAN. En este sitio existe una proporción también predominante de linfocitos T CD4+ CD8-, existiendo alrededor de 50% de éstos, 30% de linfocitos T CD4- CD8+ y 20% de linfocitos CD4- CD8-, según los estudios citométricos de Hiroi y Kiyono. A diferencia del TLAN, aquí se encontró mayor proporción de células T $\gamma\delta$ (30%), aunque continuó el predominio de las $\alpha\beta$. Todas las células T CD4+ CD8- expresaron TCR $\alpha\beta$, entre 5 y 10% de células T CD4- CD8+ eran $\gamma\delta$ y la población CD4- CD8- y también expresó el TCR $\gamma\delta$.

En relación con el perfil de citoquinas, se encontró que las células T CD4+ producen citoquinas pertenecientes al patrón Th2 (IL-4 e IL-5) con mayor proporción que las que producen los patrones Th0 y Th1. Estas células Th2 desempeñan un papel fundamental en la diferenciación de células B con IgA de superficie a células formadoras de anticuerpos IgA, también conocidas como células plasmáticas. Además, un elemento estructural en esta zona es la presencia de vénulas endoteliales altas (VEA) las cuales son importantes en el "homing" de las poblaciones linfoides que se localizan

en esta región. Tomando juntas todas estas observaciones es posible inferir que la lámina propia constituye un sitio predominantemente efector.

La anatomía de la nasofaringe muestra una conexión estrecha entre la mucosa nasal y el oído medio a través de la trompa de Eustaquio, entre la mucosa nasal y la ocular mediante el conducto lagrimal y entre la nasal y la cavidad oral por medio del conducto nasofaríngeo y entre la mucosa nasal y el tracto broncopulmonar a través del conducto nasofaríngeo, la laringe y la tráquea. Estas conexiones anatómicas ofrecen oportunidades a los patógenos a alcanzar los ojos, el oído medio, la boca y el tejido broncopulmonar, por lo que el tejido linfóide nasofaríngeo juega un rol crucial en la defensa de todos estos tejidos contra los gérmenes que penetran por vía aérea.²¹

La inmunización intranasal contra *Haemophilus influenzae*, un agente causal de otitis media, induce títulos de anticuerpos específicos en el lavado ótico y células T de memoria específicas en la mucosa del oído medio. La efectividad de la protección del oído medio a través de la inmunización intranasal, indica que el tejido nasal es una puerta de entrada para patógenos del oído medio.^{21,22}

Inducción de respuesta inmune en el TLAN

La naturaleza de la interacción entre los antígenos, la mucosa nasal y el TLAN depende de la composición, la dosis y la frecuencia de administración del antígeno, así como de la integridad del epitelio. Los antígenos solubles pueden penetrar fácilmente el epitelio nasal por fuera de las células M y entrar en contacto con las células presentadoras de antígenos (CPA) localizadas en la lámina propia, las cuales los transportan hacia los linfonodos cervicales superficiales (LNCS), pasando luego a los linfonodos cervicales posteriores (LNCPs) a través de los cuales se induce una respuesta inmune sistémica o un estado de tolerancia inmunológica específica.

Por otro lado, los antígenos particulados pueden ser eliminados fácilmente de la mucosa gracias al sistema mucociliar. Sin embargo, cuando estos antígenos logran adherirse al epitelio, pueden penetrar a través de las células M, ser procesados por las células presentadoras de antígenos presentes en el TLAN, las que drenan hacia los linfonodos cervicales posteriores, los cuales están involucrados en la inducción de una respuesta inmune secretoria, dominada por la generación de células formadoras de anticuerpos IgA específica.^{2,3}

Aún no están totalmente dilucidados todos los factores y los mecanismos que determinan la inclinación hacia una o hacia otra respuesta, pero sí existen evidencias de que los linfonodos cervicales superficiales ejercen funciones supresoras/activadoras, mientras que en los linfonodos cervicales posteriores existe un microambiente principalmente estimulador de la respuesta IgA específica.^{2,3} Es también posible que los antígenos particulados que entran a través de las células M encuentren un microambiente en el TLAN que propicia la activación inmunológica.

Una vez ocurrida la inducción de la respuesta inmune con la consiguiente proliferación, diferenciación y activación celular, comienza un proceso de recirculación linfocitaria, gracias al cual es posible encontrar efectores inmunológicos tanto en la propia mucosa respiratoria como en otras mucosas distantes al sitio de inducción. Esto constituye una prueba de que aun cuando existen determinadas particularidades en los diferentes sitios de inducción en las mucosas (nasofaringe, mucosa bronquial y placas de Peyer, entre otras), existe un sistema inmune común en las mucosas, armónicamente integrado y a la vez compartimentalizado, eficaz contra los agentes patógenos procedentes del ambiente.^{6,7,20} Aunque el TLAN y las placas de Peyer son sitios importantes de inducción inmune en mucosas, existen diferencias. Las placas de Peyer pueden ser los sitios centrales en la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas secretorias, mientras que el TLAN parece estar involucrado más en respuestas celulares.²

Formulaciones antigénicas para uso intranasal

Aunque en los últimos años ha habido un creciente interés en desarrollar formulaciones para uso en inmunizaciones intranasales, ya en los años 20 se reportaron evidencias de que la administración por vía nasal podría ser útil para inmunizar contra determinadas enfermedades, cuando Peters y Allison en 1929 investigaron la posibilidad de inducir inmunidad contra la fiebre escarlatina por aplicación repetida de la toxina eritrogénica en la mucosa nasal. En este estudio, de un grupo de 62 humanos que fueron evaluados, 46 mostraron inmunidad (reportado por Almeida AJ et al⁹). El mayor conocimiento del tejido linfoide asociado a mucosa respiratoria y su funcionamiento, así como el desarrollo de nuevas formulaciones adyuvantes y sistemas de liberación, han permitido retomar las investigaciones básicas y aplicadas relacionadas con esta vía de inmunización.

Teniendo en cuenta que para obtener resultados favorables en una inmunización intranasal es necesario lograr que el antígeno pueda ser captado por las células M del TLAN, para, a partir de ahí, generar una respuesta inmune específica significativa y que en la actualidad la mayoría de los antígenos que se emplean en las vacunas son de nueva generación, como los péptidos sintéticos o recombinantes, es imprescindible utilizar formulaciones en las que estos antígenos se combinen con elementos que faciliten su adherencia a la mucosa y su penetración. El uso de los adyuvantes inmunológicos constituye una excelente alternativa para lograr este objetivo.^{10,24}

Los adyuvantes son sustancias de naturaleza química diversa que han sido utilizadas para potenciar la respuesta inmune desde hace más de 70 años. El adyuvante completo de Freund ha sido el más utilizado y el más potente de los que se han empleado en inmunología experimental; sin embargo, los efectos adversos que produce no permite su utilización en vacunas humanas^{25,26} y actualmente se trabaja en

reducir su uso y aun sustituirlo completamente por otros menos tóxicos en procedimientos con animales de laboratorio.²⁷ Por otro lado, el hidróxido de aluminio es el único adyuvante licenciado para ser utilizado en humanos por su bajo perfil de toxicidad, aunque este producto ya no satisface las necesidades actuales en vacunas, especialmente cuando se requiere obtener respuestas celulares significativas.

En general, los adyuvantes han sido ampliamente utilizados por la vía parenteral para obtener respuestas inmunes sistémicas; sin embargo, su aplicación en la estimulación de inmunidad vía mucosa ha sido menor, siendo una dificultad el logro de una adecuada adherencia del antígeno y el adyuvante a la superficie de la mucosa. A pesar de esto, existen numerosas investigaciones que demuestran la eficacia de varios adyuvantes en la inducción de una respuesta inmune en las mucosas e incluso sistémica utilizando la vía intranasal.⁴

Uno de los adyuvantes más utilizados para las mucosas y considerado el más potente en la actualidad es la toxina colérica producida por *Vibrio cholerae*, al igual que otra toxina homóloga, la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Ambas son estructuralmente muy semejantes, con dos subunidades A y B.^{19,28-31}

La toxicidad de ambas toxinas en mucosas radica en el componente A, el cual puede ser disociado en dos piezas A1 y A2. A1 cataliza la ADP ribosilación de las proteínas que se unen a GTP en la superficie basolateral de la célula epitelial con incremento de los niveles intracelulares de AMP, lo cual conlleva a la secreción de agua y electrolitos en la luz de las mucosas. En esto radica fundamentalmente la toxicidad de la toxina colérica.

Se han utilizado varias estrategias para disminuir la toxicidad de la toxina colérica (TC). Una de ellas es utilizar sólo la subunidad B (TCB) con la cual se disminuye significativamente la adyuvancia, por lo que se requiere la adición de pequeñas cantidades de TCA. El uso de TCB recombinante, así como la manipulación molecular por ingeniería

genética a través de la cual se logra realizar mutaciones bien definidas, u obtener proteínas de fusión como las logradas entre TCA y un dominio de la proteína A de *S. aureus*, constituyen opciones que permiten disminuir la toxicidad mientras se mantiene la adyuvancia.³⁰

Estas toxinas han sido y están siendo ensayadas con múltiples antígenos microbianos. Una de las aplicaciones más prometedoras de estas toxinas podría ser como adyuvante para una vacuna vía mucosa contra influenza; sin embargo, la toxicidad y la alergenicidad son problemas que deben ser resueltos.^{31,32}

Los sistemas particulados han sido aplicados por vía intranasal con evidencias de inducción de respuesta inmune específica. La penetración de bacterias y virus, tanto natural como experimentalmente, indican la existencia de una vía para la toma de partículas por vía nasal.³³ La absorción de partículas fluorescentes de poliestireno en ratas y otros sistemas particulados han demostrado mecanismos similares a los encontrados en las placas de Peyer. En el caso de penetración por nasofaringe, estas partículas drenan a los linfonodos cervicales posteriores, con la obtención de fuertes respuestas mediadas por IgA. Se han utilizado con éxito los lactobacilos como sistemas replicantes para la penetración de la inmunidad vía mucosas.³⁴ Al parecer, los sistemas replicantes tienen ventajas en cuanto a la estimulación inmunológica en mucosa en comparación con los no replicantes, debido a la capacidad que aquéllos tienen de colonizar la mucosa.

También se ha especulado sobre el tamaño óptimo de las partículas para ser absorbidas por las células M. En estudios realizados en células M de las placas de Peyer se ha observado un amplio rango de tamaños de partículas con capacidad de inducción inmunológica vía mucosas. Por otro lado, en estudios realizados en TLAN, se observó que los hematíes de carnero (antígenos T dependientes) no inducían adecuadas respuestas y se asumió que tal vez el tamaño de

estas células de alrededor de 7 μm era una de las causas. Sin embargo, luego se evidenció que la ovoalbúmina encapsulada en partículas de alginato de hasta 40 μm de diámetro indujo una fuerte respuesta en mucosas. Este resultado pone en duda el criterio existente de que 5 μm constituye un tamaño límite en relación con el diámetro de partículas para la estimulación de una respuesta inmune en mucosas.^{35,36}

Dentro de los sistemas particulados, las micro y nano partículas han sido extensamente estudiadas. Las microesferas de poly (lactide-co-glycolides) (PLGs) son partículas biodegradables y biocompatibles que han sido ampliamente utilizadas en cirugía como material de sutura. Estos compuestos han sido ensayados con múltiples antígenos para inmunizaciones intranasales y se ha demostrado su potencial en la protección de la superficie mucosa.³⁷

Una de las propiedades que más se aprovechan de este producto es su biodegradabilidad que permite la liberación lenta de antígenos desde el sitio de inoculación; también promueve el atrapamiento y retención de los antígenos en los linfonodos locales. Además, esas partículas son captadas por los macrófagos y células dendríticas, lo que incrementa su capacidad de presentación antigénica y la elaboración de citoquinas importantes en la fase de inducción de respuesta inmune.³⁸ De igual modo, ha sido demostrado que estas micropartículas favorecen un patrón Th1.³⁹ Pero sin lugar a dudas, uno de los mayores intereses con estos adyuvantes es la de servir como sistemas de liberación de antígenos en vacunas para ser aplicados a dosis única.³⁷

Los liposomas, vesículas formadas por bicapas lipídicas tipo membranas simples o multilaminares con un tamaño entre 20 nm y 3 μm , constituyen un grupo interesante de adyuvantes que han demostrado sus propiedades inmunoestimulantes al ser administrados conjuntamente con el antígeno, ya sea unido a la membrana cuando las moléculas son lipofílicas y anfipáticas o en el espacio intermembranal si la molécula es hidrofílica, obtenién-

dose excelentes resultados cuando son utilizados por vía mucosa para la inducción de respuestas antígeno-específicas. Los liposomas tienen la capacidad de facilitar la captación del antígeno por las células presentadoras de antígenos, y son efectivos en la inducción de linfocitos T citotóxicos. Por su naturaleza anfifílica, son capaces de incorporar sustancias inmunomoduladoras que incrementan su eficacia.^{40,42}

En la actualidad, el uso de estructuras lipídicas polares presentes en archaeobacterias confieren gran estabilidad a los liposomas denominados en este caso archaeosomas, los cuales inducen fuerte respuesta humoral, inmunidad celular y memoria. Aún no se han publicado trabajos que demuestren la efectividad de archaeosomas en nasofaringe.⁴³⁻⁴⁵

Otra interesante modalidad de liposomas, los cocleatos, son bicapas lipídicas enrolladas en espiral, sin espacios acuosos internos y con iones calcio que enlazan las capas adyacentes. Han sido utilizados por vía mucosa con resultados muy favorables, obteniéndose respuestas inmunes potentes y duraderas, tanto celulares como por anticuerpos, luego de su aplicación por diferentes vías, incluyendo oral, intranasal, además de las vías intramuscular y subcutánea.⁴⁶

Los ISCOMs o complejos inmunoestimulantes constituyen otros adyuvantes particulados con un tamaño entre 30 y 60 nm. Fueron descritos por Morein y colaboradores en 1984.⁴⁷ Estas estructuras se presentan en dos variantes: el primero es el clásico ISCOM formado por una combinación de colesterol, saponinas, fosfolípidos y proteínas anfipáticas. El segundo es en esencia la misma estructura, pero sin las proteínas, y se conoce como ISCOMATRIX. Estas estructuras que pueden acoplar una gran variedad de antígenos han sido evaluadas en la inducción de inmunidad en las mucosas aplicadas por vía oral; sin embargo, aún no existen suficientes reportes de su utilización intranasal.⁴⁸

Una novedosa propuesta la constituyen las vacunas de ADN/ARN. Desde hace más de 20 años

se ha establecido que los ribosomas bacterianos y el ARN ribosomal pueden ser inmunogénicos y protectores contra infecciones.⁴⁹ En la actualidad, el uso de vacunas de ADN ha ido ganando espacio entre las vacunas con mayores perspectivas de desarrollo.^{50,51}

Estudios recientes han evidenciado que determinadas secuencias de ADN bacteriano tienen la capacidad de actuar como potentes estimuladores de la respuesta inmune y que este efecto es debido a secuencias no metiladas de dinucleótidos CpG que son inmunoestimuladores cuando se presentan en el contexto de ciertas bases en los extremos. Estas estructuras están presentes en una frecuencia de 1/16 bases en el ADN bacteriano, y en los vertebrados su frecuencia es mucho menor (1/50 a 1/60 bases), donde están casi siempre metiladas.⁵²

Las secuencias de ADN CpG bacterianas actúan como señales de daño que el sistema inmune innato de los vertebrados pueden reconocer como extrañas y desencadenar una respuesta inmune.⁵³ Sobre este criterio se están evaluando como adyuvantes de vacunas por vía mucosa y parenteral y, hasta el momento, se han evidenciado potentes acciones inmunoestimulantes con un aceptable perfil de inocuidad.⁵⁴⁻⁵⁶

Conclusiones

Aunque la mucosa nasal está establecida como una vía alternativa potencial para la administración de vacunas, aún no han sido explotadas todas sus posibilidades para la inducción de respuestas inmunes. Se han realizados muchos estudios en los que se describen las células y los sitios implicados tanto en la fase de inducción como efectora de la respuesta inmune. Uno de los hallazgos más interesantes consiste en la demostración de que con la aplicación intranasal de antígenos es posible lograr respuestas específicas no sólo localmente, sino en tejidos distantes como la vagina, lo cual permite diseñar vacunas para la prevención de infecciones de transmi-

sión sexual utilizando esta vía. No obstante, si tenemos en cuenta que por vía respiratoria penetran un gran número de gérmenes que producen infecciones que generan alta mortalidad en todo el mundo, como las neumonías, la tuberculosis, las meningocefalitis y la gripe, entre otras, es posible comprender por qué existe un marcado interés en desarrollar formulaciones de vacunas para uso intranasal que permitan desarrollar una adecuada protección desde la puerta de entrada para la prevención de estas enfermedades.

En este campo, uno de los focos de mayor atención es la búsqueda de adyuvantes y vehículos para ser utilizados en formulaciones que permitan una adecuada transportación de las moléculas antigénicas hacia los sitios inductores donde se encuentran las células M, así como una adecuada y duradera inmunoestimulación sin la generación de efectos adversos. En este sentido, están siendo evaluados varios productos, fundamentalmente particulados, algunos de los cuales podrán ser considerados en un futuro para ser utilizados en formulaciones de vacunas.

Mientras tanto, continúan las investigaciones para dilucidar otros mecanismos inmunológicos que participan en la respuesta inmune en nasofaringe, fundamentalmente celulares, lo cual permitirá un mejor diseño de vacunas, con especial interés en las que actúan contra gérmenes intracelulares, como las micobacterias, los hongos y los virus, e incluso para el desarrollo de formulaciones que sirvan como herramientas terapéuticas o preventivas contra las células neoplásicas.

Bibliografía

1. Bienenstock J. The nature of immunity at mucosal surfaces – a brief review. In: Donachie W, Griffiths E, Stephen J. (eds) *Bacterial infections of the respiratory and gastrointestinal mucosa*. Oxford: IRL Press, 1988: 9-18.
2. Kuper CF, Koomstra PJ, Hameleers DHM, Biewenga J, Spit BJ et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992; 13: 219-224.
3. Almeida AJ, Alpar HO. Nasal delivery of vaccines. *J Drug Targ* 1996; 3: 455-467.

4. Hiroi T, Kiyano H. NALT immune system for the development of mucosal vaccine. 10th International Congress of Immunology. Monduzi Ed, 1998: 1565-1571.
5. Holmgren J. European Commission CUST/STD Initiative Report of the Expert Panel VI. *Concerted efforts in the field of mucosal immunology*: 644-664.
6. Bergquist CH, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 1997; 65 (7): 2676-2684.
7. Jertborn M, Nordstrom I, Kilander C, Czerkinsky C, Holmgren J. Local and systemic immune responses to rectal administration of recombinant cholera toxin B subunit in humans. *Infect Immun* 2001; 69 (6): 4125-4128.
8. Czerkinsky C, Holmgren J. Induction of immunity at mucosal surfaces: From vaccine development to specific immunotherapy. *Dyn Nutr Res* 1995; 4: 161-173.
9. Quiding M, Lakew M, Granstrom G, Nordstrom I, Holmgren J, Czerkinsky C. Induction of specific antibody responses in the human nasopharyngeal mucosa. In: Mestecky J. *Advances in mucosal immunology*. New York: Plenum Press, 1995: 1445-1450.
10. Chen H. Recent advances in mucosal vaccine development. *J Control Rel* 2000; 67: 117-128.
11. Asanuma H, Inaba Y, Arzawa C, Kurata T, Tamura S. Characterization of mouse nasal lymphocytes isolated by enzymatic extraction with collagenase. *J Immun Meth* 1995; 187: 41-45.
12. Bienenstock J. The lung as an immunologic organ. *Ann Rev Med* 1984; 35: 49-62.
13. Spit BJ, Hendriks EG, Bruijntjes JP, Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tiss Res* 1989; 255: 193-198.
14. Asanuma H, Thompson AM, Iwasaki T, Sato Y, Inaba Y, Aizawa CH et al. Isolation and characterization of mouse nasal associated lymphoid tissue. *J Immunol Meth* 1997; 202: 123-131.
15. Gebert A. Identification of M cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and *in vivo* protein transport. *Histochem Cell Biol* 1995; 104: 211-220.
16. Van Loveren H, Romboot PJ, Fischer RH, Lebret E, Van Bree L. *Effects of oxidant air pollution on resistance to respiratory infection*. A review. Repar 61900 2003. Bilthoven: National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1993.
17. Smith MW, Thomas NW, Jenkins PG, Miller NG, Cremaschi D, Orta C. Selective transport of microparticles across Peyer's patch follicle-associated M cells from mice and rats. *Expl Physiol* 1995; 80: 735-743.
18. Gebert A, Bartels H. Ultrastructure and protein transport of M cells in the rabbit cell. *Pathoanat Rec* 1995; 241: 487-495.
19. Tamura S, Yamanaka D, Shimohara M, Tamita TT, Kumase K, Tsuda Y. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *E. coli* Heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 419-426.
20. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992; 72 (4): 853-879.
21. Feron VJ, Arts JH, Kuper CF, Slootweg PJ, Woutersen RA. Health risks associated with inhaled nasal toxicants. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31 (3): 313-347.
22. Filici F, Masieri S, Zambetti G, Orlando M. Nasal hypersensitivity in purulent middle ear effusion. *Allergol Immunopathol* 1997; 25: 91-94.
23. Kodama S, Suenaga S, Hirano T, Suzuki M, Mogi G. Induction of specific immunoglobulin A and Th2 immune responses to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in middle ear mucosa by intranasal immunization. *Infect Immun* 2000; 68: 2294-2300.
24. Fitzgerald D, Msny RT. New approaches to antigen delivery. *Crit Rev Ther Drug Car Syst* 2000; 17 (3): 165-248.
25. Stewart-Tull DES. Freund-type mineral oil adjuvant emulsion. In: Stewart-Tull-Des. *The theory and practical application of adjuvants*. Clap, Om: John Wiley & Sans, 1995
26. Lindblad BE. Freund's Adjuvants. In: O'Hagan, D.T. *Methods in molecular medicine*. Vol 42. Vaccine adjuvants: Preparation methods and research protocols. Totowa, NJ: Human Press, 2000: 49-63.
27. Lindblad BE, Hau J. Escaping from The use of Freund's complete adjuvant In: Balls, M, van Zeller PM, Halder ME. Progress in the reduction refinement and replacement of animal experimentation. *Elsevier Science*, 2000: 1681-1685.
28. Goto N, Maeyama JJ, Yasuda Y, Isaka M, Matano K, Kazuka S et al. Safety evaluation of recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant. *Vaccine* 2000; 18 (20): 2164-2171.
29. Hagiwara Y, Komase K, Chen Y, Matsuo K, Susuki Y, Aizawa C et al. Mutans of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1999; 17 (22): 2918-2926.
30. Agren CC, Ekman L, Lowenadler B, Lycke NY. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J Immunol* 1997; 158 (8): 3936-3946.
31. Tamura S, Kurata T. A proposal for safety standards for human's use of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) derivatives as an adjuvant of nasal inactivated influenza vaccine. *Jpn J Infect Dis* 2000; 53: 98-106.
32. Novak M, Moldoveanu 2, Schafer D.R, Mestecky J. Murine model of protective immunity to influenza virus. *Vaccine* 1993; 11: 33-60.
33. Alpar HO, Almeda AJ, Brown MRW. Microspheres application by the nasal mucosa of the rat. *J Drug Targ* 1994; 2: 147-149.
34. Congemi GR, Santn VD, Nader MEM. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* on the respiratory react of mice. *Biol Pharm Bull* 2000; (23) 8: 973-978.
35. O'Hagan DT, Odd SG, Van Nest G. Recent advances in vaccine adjuvants: The development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Mol Med Tod* 1997; 3 (2): 69-75.
36. Hillery AM. Microparticulate delivery systems: potential drug/vaccine carrier via mucosal routes. *Pharm Sci Tech Tod* 1998; 2: 269-275.
37. O'Hagan DT, Single M, Gupta RK. Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv Drug Del Rev* 1998; 32: 225-246.
38. Gupta RK, Chang AC, Siber GR. Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems. *Dev Biol Stand* 1998; 3: 63-78.
39. Moore D, Mc Gurek, Adams S, Jores, WC, McGee, OHagan DT, Mills KH. Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes and CD4+ Th1 cells. *Vaccine* 1995; 13: 1741-1749.
40. Gregoriadis G. Immunological adjuvants: A role for liposomes. *Immunol Today* 1990; 3: 89-97.
41. Wilschut J, de Haan A, Geerligs HJ, Huchshorn JP, van Small Scharrenburg GJ et al. Liposomes as a mucosal adjuvant system: an intranasal liposomal influenza subunit vaccine and the role of IgA in nasal anti-influenza immunity. *J Liposome Res* 1994; 4 (1): 301-314.
42. Panico A, Pignatello R, Cardile V, Puglisi G. Preparation of liposome formulation containing immunomodulatory peptide. *Pharm Act* 1997; 72: 1-10.

43. Sprott GD, Tolson DL, Patel GB Archaeosomes as novel antigen delivery system. *FEMS. Microbiol Letter* 1997; 159: 17-22.
44. Krishnan L, Dicairech J, Patel GB, Sprott DG. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral cell-mediated and memory response comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun* 2000; 68 (1): 54-63.
45. Krishnan L, Sad S, Patel GB, Sprott GD. The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activities of macrophages and dendritic cells in vivo. *J Immunol* 2001; 1885-1893.
46. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scolpino AJ, Wang Z, Zhang F et al. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32 (3): 273-287
47. Morein B, Sundquist B, Hoglund S, Osterhaus D. ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane protein from enveloped viruses. *Nature* 1984; 308: 457-460.
48. Sjolander A, Cox JC, Barr GI. Iscoms: an adjuvant with multiple functions. *J Leuk Biol* 1998; 64:713-723.
49. Fontages R, Robert D, Contest Y, Dis G. Study of the immunogenicity of ribosomes and ribosomal RNA extracted from *K. pneumoniae* and *S. pneumoniae*. *Arzneimittelforschung*, 1980; 30: 142-172.
50. Giese M. DNA-antiviral vaccines. New development and approaches. A review. *Virus Genes* 1998; 17 (3): 219-232.
51. Thalhamer J, Leitner W, Hammerl P, Brtko J. Designing immune responses with genetic immunization and immunostimulatory DNA sequences. *Endocrinol Reg* 2001; 35: 143-166.
52. Bird AP. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Gen* 1987; 342-346.
53. Krieg AM, Matson S, Fisher E. Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of immune stimulation by CpG motifs. *Antisense Res Dev* 1996; 6: 133-139.
54. Davis HL, Weerafna R, Waldschmidt TJ, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160: 870-76.
55. Krieg AM. Immune effects and mechanism of actions of CpG motifs. *Vaccine* 2001; 19: 618-622.
56. McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL. Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol Med* 2000; 6 (10): 867-877.

IV Jornadas Latinoamericanas de Residentes de Patología Clínica, Bolivia, 2004

Estimados médicos residentes de Patología Clínica en Latinoamérica:

Como ya es tradición, en el marco del XVII Congreso Latinoamericano de Patología Clínica a realizarse en la Paz Bolivia, en el 2004, se llevarán a cabo las IV Jornadas Latinoamericanas de Residentes de Patología Clínica.

Están programados simposia, casos clínicos y presentación de trabajos libres. Una ventana al futuro en la difusión científica y académica de la especialidad.

Se les invita a preparar con la debida anticipación el material académico que deseen presentar, y planear lo conducente para asistir y participar activamente.

Para mayores informes dirigirse a:

Los Coordinadores

Dra. Rosa María García Escamilla
Vicepresidenta de Educación Continua y
Actividades Científicas de ALAPAC, A.C.

alapaccientificayeduca@latinmail.com
romaescamilal@latinmail.com
patclinresidentesXXI@servidor.unam.mx

México. D. F, México

Dr. Ramón Suárez Zaldú
Expresidente de ALAPAC, A.C.

rasuzal@adinet.com.uy

Montevideo, Uruguay

