

## CITOQUINAS INDUCIDAS POR LA INMUNIZACION EXPERIMENTAL ANTITETANICA EFECTO DE LA FORMULACION VACUNAL

MARISA CASTRO<sup>1</sup>, NANCY MATEO<sup>2</sup>, VICTORIA LAVIGNE<sup>1</sup>, SILVANA DELUCHI<sup>2</sup>, CARLOS ATZORI<sup>2</sup>,  
LUCIANA PIUDO<sup>2</sup>, MARIA LUISA BRERO<sup>2</sup>, MARCELA MANGHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, IDEHU (CONICET/UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. <sup>2</sup>Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos Dr. CG Malbrán, Buenos Aires

**Resumen** Las diferentes formas de presentación antigénica, que dependen principalmente del tamaño y la solubilidad de los antígenos, constituyen uno de los factores que intervienen en la modulación de la respuesta inmune. Actualmente, con el fin de minimizar el número de inoculaciones del plan de vacunación, se tiende a utilizar vacunas cada vez más complejas donde diferentes antígenos se combinan. El objetivo de este trabajo fue evaluar en ratones BALB/c, si la respuesta al toxoide tetánico se modifica cuando está acompañado de otros antígenos en la formulación de la vacuna. Para las vacunas DTPw (formada por los toxoides diftérico, tetánico y *Bordetella pertussis* inactivada) y DTPaSt (ambos toxoides, antígenos solubles de *B. pertussis* y *Salmonella typhi* inactivada) se observó una respuesta antitetánica mixta T helper 1 y T helper 2, con producción de interferón gamma, interleuquina 5 e interleuquina 6. En cambio, para la vacuna DTPa la respuesta fue T helper 2, con producción de Interleuquina 5 y 6. Sólo la inmunización con DTPw indujo altos niveles de IL-12 con respecto al grupo control (ratones inoculados con solución fisiológica). Nuestros resultados evidencian que la respuesta al toxoide tetánico se modifica con la adición de antígenos particulados como *B. pertussis* o *S. typhi*. Sin embargo, la respuesta original se mantiene cuando está acompañado de otros antígenos solubles.

**Palabras clave:** respuesta antitetánica, modulación Th1/Th2, citoquinas, antígenos solubles/particulados

**Abstract** *Cytokines induced by experimental anti-tetanus immunization. Vaccine-formulation effect.*

Several factors are involved in the selective activation of T helper 1 or T helper 2 cells, such as the type of antigen-presenting cells involved in the immune response and the different physical characteristics of antigens. The aim of this work was to evaluate if adding other antigens to tetanus toxoid modifies the original immune response. BALB/c mice were immunized with tetanus and diphtheria toxoids associated with whole-cell *Bordetella pertussis* (DTPw vaccine), *B. pertussis* soluble antigens (DTPa vaccine) or *Salmonella typhi* plus DTPa (DTPaSt vaccine). DTPw and DTPaSt immunization induced a T helper 1/T helper 2 (Th1/Th2) anti-tetanus response with gamma interferon and interleukin 5 production. DTPa immunization induced a Th2 response with production of interleukin 5 and interleukin 6. Only DTPw vaccine induced higher levels of IL-12 in non-immunized mice. Our findings indicate that the co-injection of whole-cell antigens such as *B. pertussis* or *S. typhi*, modifies the anti-tetanus response shifting it from Th2 to Th1 type. However, the original Th2 immune response is not modified when the vaccine consists only of soluble antigens.

**Keywords:** anti-tetanus response, Th1/Th2 modulation, cytokines, soluble/particulate antigens

El conocimiento actual sobre la respuesta inmune permite analizar mejor el efecto de los inmunógenos contenidos en las diversas vacunas.

En los últimos años, las vacunas empleadas para conferir protección contra tétanos, difteria, tos convulsa (*Bordetella pertussis*) y salmonelosis, han sufrido modi-

ficaciones en su forma de administración tendientes a disminuir el número de inmunizaciones en la población. Así, los toxoides tetánico (T) y diftérico (D) fueron asociados a los componentes *B. pertussis* entero (Pw), a sus antígenos solubles (Pa) o a *Salmonella typhi* (St). En estas asociaciones de antígenos vacunales se intenta que cada uno de los componentes mantenga su actividad protectora.

Frente a infecciones bacterianas, el huésped monta diferentes tipos de respuesta inmune según el patógeno sea intracelular o extracelular. La infección con microorganismos intracelulares conduce principalmente

Recibido: 7-VIII-2001

Aceptado: 14-I-2002

**Dirección postal:** Dra. Marcela Manghi, IDEHU, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4964-0024 e-mail: manghim@ffybu.uba.ar

a la activación de linfocitos T helper (Th) 1 con producción de citoquinas pro-inflamatorias, favoreciendo la depuración del patógeno y la destrucción de células infectadas. En cambio, los patógenos extracelulares estimulan la producción de anticuerpos contra sus toxinas mediante la activación de clones de linfocitos Th2 con producción de citoquinas sin actividad inflamatoria<sup>1,2</sup>. Estos conocimientos son tenidos en cuenta en el desarrollo de nuevas vacunas al considerar que para conferir protección al huésped, la vacunación debe emular la respuesta inmune generada por una infección.

Con el propósito de establecer si las asociaciones de antígenos modifican el tipo de respuesta inmune original, nos propusimos estudiar la respuesta antitética que se genera por inmunización con las vacunas DTPw, DTPa y DTPaSt, evaluando los niveles de interleuquina (IL) 5, IL-6, IL-12 e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones inmunizados.

## Materiales y métodos

**Animales:** se emplearon ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) provistos por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria que fueron agrupados de a 5 y mantenidos en cuarentena durante 96 horas antes de ser inmunizados.

**Vacunas:** se emplearon tres vacunas, a saber: Aventis-Pasteur DTPw (30 límites de floculación por mililitro (Lf/ml) de toxoide diftérico, 10 Lf/ml de toxoide tetánico y 30 unidades opacimétricas por mililitro (UO/ml) del *B. pertussis* entera), Aventis-Pasteur DTPa (30 Lf/ml de toxoide diftérico, 10 Lf/ml de toxoide tetánico, 20 microgramos por mililitro ( $\mu$ g/ml) de toxoide pertúsico, 10  $\mu$ g/ml de hemaglutinina filamentosa, 6  $\mu$ g/ml de pertactina y 10  $\mu$ g/ml de aglutinógenos 2 y 3), DTPaSt ( $3 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) de *Salmonella typhi* inactivada por calor adicionadas a la vacuna DTPa). Las vacunas se diluyeron en solución fisiológica estéril (SF) para obtener 2 Lf/dosis de toxoide tetánico.

**Inmunizaciones:** la inmunización de los ratones se llevó a cabo los días 0, 7 y 21, inoculando por vía sc 0.5 ml de cada dilución de vacuna distribuido en dos inóculos sobre el lomo. Se utilizó SF como control.

**Cultivos de células:** doce días después de la última inmunización, se extrajo el bazo de cada uno de los ratones para procesarlo en forma individual. El medio de cultivo empleado fue RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100 unidades internacionales por mililitro (UI/ml)), estreptomycin (100  $\mu$ g/ml), anfotericina B (0.25  $\mu$ g/ml), L-glutamina (300  $\mu$ g/ml) y piruvato (220  $\mu$ g/ml).

A un volumen (100  $\mu$ l) de cada suspensión celular ( $5 \times 10^6$  cel/ml) se le adicionó otro igual de medio de cultivo, toxoide tetánico (10  $\mu$ g/ml; Statens Serum Institut) o el mitógeno concanavalina A (ConA, 5  $\mu$ g/ml, Vector Labs). Los cultivos se llevaron a cabo por cuadruplicado a 37 °C en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>.

En cada experimento se efectuaron dos cultivos celulares en paralelo: uno para evaluar proliferación celular (96 hs de incubación), y otro para estudiar la presencia de citoquinas en los sobrenadantes (72 hs de incubación).

**Proliferación celular.** se evaluó midiendo el nivel de incorporación de timidina tritiada. El resultado correspondiente a cada animal (valor medio de cuatro réplicas) se expresó en cuentas por minuto (cpm). Los ratones fueron considerados respondedores cuando superaron el valor de corte (valor medio + 2DE) obtenido a partir de los resultados correspondientes a los cultivos de células no estimuladas (datos acumulados de 3 experiencias).

**Citoquinas:** se estudiaron por ELISA los niveles de IL-5, IL-12, INF $\gamma$  (OptEIA, Pharmingen) e IL-6 (R&D) en los sobrenadantes de cultivo individuales, que estuvieron conservados a -70 °C hasta el momento de su procesamiento. Las concentraciones en picogramos por mililitro (pg/ml) se calcularon a partir de una curva de referencia confeccionada con citoquinas recombinantes murinas. Los ratones fueron considerados productores de citoquina cuando superaron el valor de corte (valor medio + 2DE) obtenido a partir de los resultados correspondientes a los cultivos de células no estimuladas (datos acumulados de 3 experiencias).

**Análisis estadístico:** los niveles de proliferación y de las citoquinas (IL-5, IL-6 e INF $\gamma$ ) se compararon usando el test ANOVA. Los correspondientes a IL-12 fueron comparados con respecto al grupo control mediante el test de Student.

## Resultados

Las células de bazo, tanto de los animales inmunizados como de los no inmunizados, proliferaron en respuesta a la ConA.

El toxoide tetánico indujo la proliferación de los cultivos celulares provenientes de todos los animales inmunizados (Fig. 1).

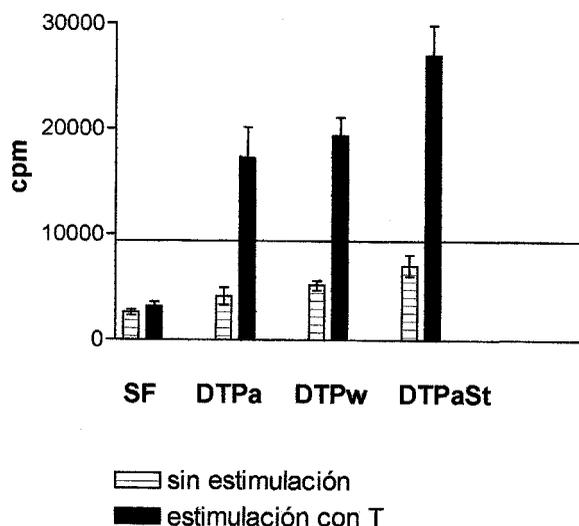


Fig. 1. – Respuesta proliferativa de células de bazo en cultivo con o sin estímulo con toxoide tetánico (T), expresada en cuentas por minuto (cpm). Cada barra representa los resultados acumulados de tres experimentos iguales. El valor de corte corresponde a la media más dos desvíos estándar del nivel de proliferación celular en cultivos sin estímulo correspondientes a todos los ratones.

Se midieron los niveles de IFN $\gamma$  e IL-5 como indicadores de respuesta antitetánica de memoria de tipo Th1 y Th2, respectivamente. Las células sensibilizadas con vacuna DTPw o DTPaSt produjeron IFN $\gamma$  a diferencia de las sensibilizadas con DTPa que no lo hicieron (Fig. 2.a). Las tres vacunas indujeron la producción de IL-5 (Fig. 2.b).

Para analizar el efecto de las inmunizaciones sobre la actividad fagocítica, se determinó el nivel de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo de células sin estimular correspondientes a todos los ratones. Las células sensibilizadas con DTPw y DTPaSt produjeron niveles mayores a los del grupo control (aproximadamente 3 y 1.5 veces, respectivamente ( $p < 0.01$ )). Para DTPa, los nive-

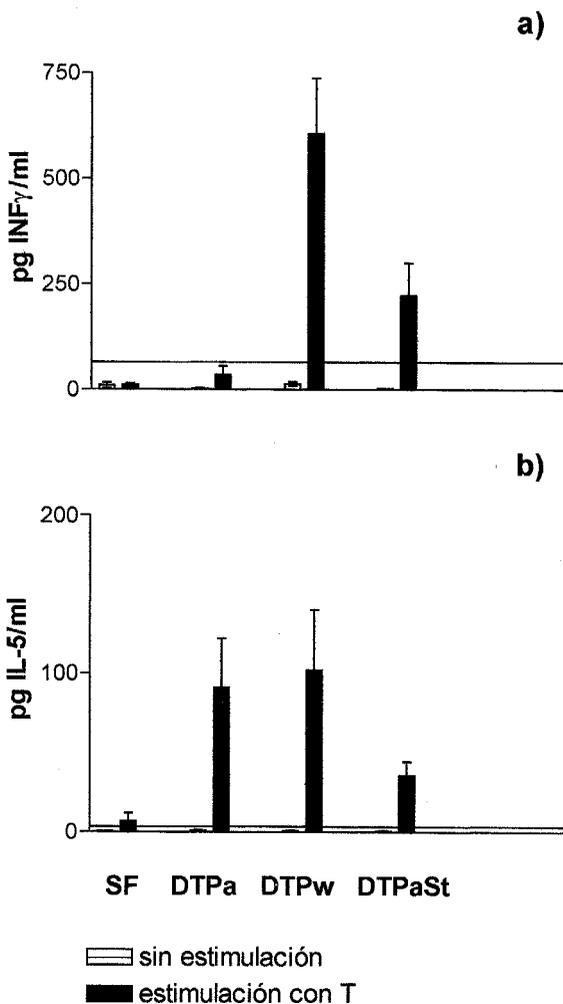


Fig. 2.- Niveles de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (a) e interleuquina 5 (IL-5) (b) en los sobrenadantes de células de bazo en cultivo con o sin estímulo con toxoide tetánico (T), expresados en picogramos por mililitro (pg/ml). Las barras representan los resultados acumulados de tres experimentos iguales. El valor de corte corresponde a la media más dos desvíos estándar del nivel de citoquina en los sobrenadantes de cultivo de células sin estimular correspondientes a todos los ratones.

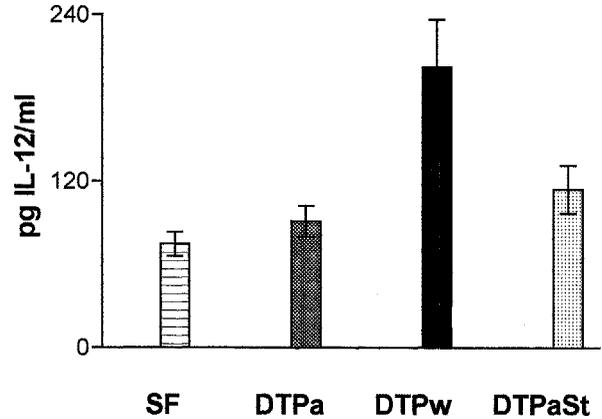


Fig. 3.- Niveles de IL-12 en los sobrenadantes de células de bazo en cultivo sin estímulo, expresados en picogramos por mililitro (pg/ml). Las barras representan los resultados acumulados de tres experimentos iguales.

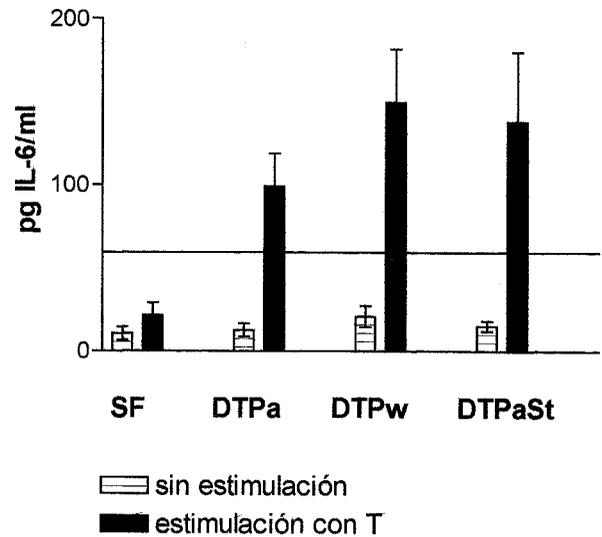


Fig. 4.- Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de células de bazo en cultivo con o sin estímulo con toxoide tetánico (T), expresados en picogramos por mililitro (pg/ml). Las barras representan los resultados acumulados de tres experimentos iguales. El valor de corte corresponde a la media más dos desvíos estándar del nivel de citoquina en los sobrenadantes de cultivo de células sin estimular correspondientes a todos los ratones.

les de IL-12 medidos no difirieron de los del grupo control ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3).

Las células sensibilizadas con cualquiera de las tres vacunas y estimuladas con toxoide tetánico produjeron niveles de IL-6 mayores al valor de corte (Fig. 4).

### Discusión

El análisis de la respuesta proliferativa específica demostró que todas las asociaciones vacunales estudia-

das generaron respuesta antitetánica de memoria. La respuesta fue de tipo Th2 para la inmunización con DTPa ya que esta vacuna indujo la producción de IL-5 y no de IFN $\gamma$ . El mismo perfil fue observado también en nuestro laboratorio cuando se analizó en ratones la respuesta originada por inmunización con la vacuna DT (datos no mostrados). La inmunización con la vacuna DTPw o DTPaSt indujo tanto la producción de IFN $\gamma$  como de IL-5 (perfil Th1/Th2). Estos resultados indican que la conocida respuesta antitetánica de tipo Th2 no se modifica cuando otros antígenos solubles acompañan al toxoide tetánico en la formulación de la vacuna. Sin embargo, la inclusión de antígenos particulados como Pw o St modulan esta respuesta al tipo mixto, Th1/Th2. Es muy probable que estas observaciones estén relacionadas con diferentes formas de presentación antigénica ya que se sabe que las células fagocíticas como los macrófagos presentan preferentemente antígenos de gran tamaño y están asociadas con la inducción de respuesta Th1, mientras que las células B presentan más eficientemente antígenos pequeños o solubles estimulando la respuesta Th2<sup>3-7</sup>.

Después del reconocimiento del toxoide tetánico por parte de los linfocitos B (mediante sus receptores de membrana), los clones de linfocitos T específicos disponibles para colaborar en la respuesta son diferenciados al tipo Th2 por la acción de las citoquinas generadas durante la presentación (es el caso de DT y DTPa). Simultáneamente y en el mismo escenario, los antígenos particulados (Pw, St) son presentados por los macrófagos y por ende inducen la producción de citoquinas que conducen a la diferenciación de los linfocitos Th0 a Th1. Es probable que los linfocitos Th0 específicos para el toxoide tetánico, a partir de los cuales se originarán los clones que colaboran en la respuesta, puedan diferenciarse a Th1 o a Th2, según como sea el entorno de citoquinas producidas por las diferentes células presentadoras, explicándose así la respuesta antitetánica mixta que se observó luego de la inmunización con DTPw y DTPaSt.

La correlación entre IL-12 e IFN $\gamma$  observada para DTPw y DTPaSt está de acuerdo con la conocida participación de IL-12 en la inducción de linfocitos Th1<sup>8-12</sup>. Los niveles menores de IL-12 observados para DTPaSt, podrían deberse al efecto inhibitorio de la fitohemaglutinina (FHA, antígeno soluble de *B.pertussis* y componente de la DTPa) sobre la producción de esta citoquina por macrófagos murinos<sup>13</sup>.

El análisis de los resultados de IL-6 merece consideración aparte debido a su controvertida clasificación<sup>8, 14-16</sup>. Si se tiene en cuenta su actividad pro-inflamatoria ya reportada, los mayores niveles producidos por las células sensibilizadas con DTPw y DTPaSt después de ser estimuladas con toxoide tetánico, están en relación con la necesidad de una respuesta inflamatoria para la eliminación de patógenos intracelulares como *B. pertussis*

*S. typhi*. Si lo que se considera es su condición de citoquina tipo Th2, no sorprende que la inmunización con DTPa induzca la producción de IL-6 además de IL-5. Esto último concuerda con las observaciones de Aoki et al, quienes observaron en ratones BALB/c inmunizados con ovo-albúmina soluble un aumento en la producción de IL-6 por parte de las células de bazo estimuladas *in vitro* con el mismo antígeno<sup>14</sup>. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el antígeno FHA, además de tener efecto supresor sobre la producción de IL-12, es un estimulador de la producción de IL-6 e IL-10<sup>13</sup>.

Si bien todas las vacunas analizadas tienen Al(OH)<sub>3</sub>, adyuvante empleado en vacunas de uso humano, no hay que descartar una posible actividad moduladora adicional dada la conocida capacidad de este adyuvante para disminuir las respuestas Th1 específicas mediante la producción de IL-4<sup>15,17</sup>.

Finalmente, habría que tener en cuenta que la sensibilización con vacuna DTPw origina la producción de IFN $\gamma$ , citoquina que se asocia a procesos inflamatorios y que no es necesaria para la protección antitetánica.

Los resultados de este estudio ponen en evidencia que la respuesta a un antígeno soluble como el toxoide tetánico se modifica cuando antígenos particulados como bacterias se incluyen en la formulación.

Los resultados de este trabajo, de ser confirmados en la respuesta inmune a la vacunación antitetánica en los humanos, podrían ser muy útiles para mejorar el diseño de las vacunas complejas.

**Agradecimientos:** este trabajo fue subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 05-04866) y por la Universidad de Buenos Aires (TB 047).

## Bibliografía

1. Sedlik C, Dériaud E, Leclerc C. Lack of Th1 or Th2 polarization of CD4<sup>+</sup> T cell response induced by particulate antigen targeted to phagocytic cells. *Int Immunol* 1997; 9: 91-103.
2. Mills KH, Barnard A, Watkins J, Redhead K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Inf Immun* 1993; 61: 399-410.
3. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-93.
4. Walker RI. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994; 12: 387-400.
5. Schmitz J, Radbruch A. Distinct antigen presenting cell derived signals induce Th cell proliferation and expression of effector cytokines. *Int Immunol* 1992; 4: 43-51.
6. Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, Fitch FW. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen presenting cell populations. *J Immunol* 1991; 146: 1750-8.
7. Dal Monte P, Szoka F. Antigen presentation by B cells and macrophages of cytochrome c and its antigenic fragment when conjugated to the surface of liposomes. *Vaccine* 1989; 7: 401-8.
8. Leal I, Smedegård B, Andersen P, Appelberg R.

- Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect Immun* 1999; 67: 5747-54.
9. Skeen M, Miller M, Shinnick T, Ziegler H. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophage in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J Immunol* 1996; 156: 1196-206.
  10. Mahon B, Ryan M, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun* 1996, 64: 5295-301.
  11. Brewer J, Roberts C, Conacher M, McColl J, Blarney B, Alexander J. An adjuvant formulation which preferentially induces Th1 cytokine and CD8+ cytotoxic response is associated with up-regulation of IL-12 and suppression of IL-10 production. *Vaccine Res* 1996; 5: 77-89.
  12. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-76.
  13. McGuirk P, Mills KH. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor. IL-10 dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemmagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* 2000; 30: 415-22.
  14. Aoki I, Aoki A, Klinman. Activation of IL-4 and IL-6 secreting cells by antigen. *Cytokine* 1995; 7: 799-805.
  15. Brewer J, Alexander J. Cytokines and the mechanisms of action of vaccine adjuvants. *Cytokines Cell Molec Therapy* 1997; 3: 01-14.
  16. Stein B, Sutherland MSK. IL-6 as a drug discovery target. *DDT* 1998; 3: 202-13.
  17. Brewer J, Conacher M, Hunter C, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol* 1999; 163: 6448-54.

-----

#### **Eclesiástico 38, BIBLIA DE JERUSALEN**

Forma parte de la Biblia Griega, en idioma griego "Sabiduría de Jesús" pero escrita en hebreo por "Ben Sirá", fragmentos encontrados en 1896 en El Cairo y más recientemente en Qumrán y Masada.

38. Da al médico por sus servicios, los honores que merece  
que también a él lo creó el Señor.  
Del Altísimo recibe el médico su arte  
y del rey recibe los obsequios.  
La ciencia del médico realza su cabeza;  
y ante los grandes es admirado.  
El Señor puso en la tierra medicinas,  
el varón prudente no las desdeña.  
¿No fue el agua endulzada con un leño  
para que se conociera su virtud?  
El mismo dio a los hombres la ciencia  
para que se gloriaran en sus maravillas.  
Con ellas cura él y quita el sufrimiento,  
con ellas el farmacéutico hace mixturas.  
Así nunca se acaban sus obras,  
y de él viene la paz sobre la haz de la tierra.