

Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
SERIE DE INFORMES TECNICOS

Nº 595

COADYUVANTES INMUNOLOGICOS

**Informe de un
Grupo Científico de la OMS**

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

GINEBRA

1976

ISBN 92 4 320595 1

© Organización Mundial de la Salud 1976

Las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones sobre reproducción de originales del Protocolo 2 de la Convención Universal de Derechos de Autor. Las entidades interesadas en reproducir o traducir en todo o en parte alguna publicación de la OMS deberán solicitar la oportuna autorización de la Oficina de Publicaciones, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. La Organización Mundial de la Salud dará a esas solicitudes consideración muy favorable.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o del nombre comercial de ciertos productos no implica que la OMS los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las marcas registradas de artículos o productos de esta naturaleza se distinguen en las publicaciones de la OMS por una letra inicial mayúscula.

PRINTED IN SWITZERLAND

INDICE

	Página
1. Introducción	5
2. Preparaciones coadyuvantes para uso humano	7
2.1 Coadyuvantes de depósito	7
2.2 Corineformas anaerobias	12
2.3 Bacilo Calmette-Guérin	14
2.4 <i>Bordetella pertussis</i>	15
3. Coadyuvantes empleados en animales de laboratorio	17
3.1 Emulsiones de agua en aceite con adición de micobacterias o nocardias	17
3.2 Lipopolisacáridos bacterianos (endotoxinas)	19
3.3 Sustancias análogas a la lisolecitina	21
3.4 Sustancias que labilizan los lisosomas	22
3.5 Polianiones	23
3.6 Polisacáridos de hongos	24
3.7 Levamisol	24
4. Los coadyuvantes en relación con la posible inmunoterapia de los tumores	24
5. Posible modo de acción de los coadyuvantes sobre la respuesta inmunológica	25
5.1 Efecto coadyuvante sobre la célula	25
5.2 Efecto de los coadyuvantes sobre las clases de anticuerpos	28
5.3 Efecto de los coadyuvantes sobre la afinidad de los anticuerpos	28
5.4 Coadyuvancia	29
5.5 Los coadyuvantes en la provocación de inmunidad de base celular	31
6. Activación de los macrófagos	33
7. Factores especiales que han de tenerse en cuenta al evaluar la idoneidad e inocuidad de los coadyuvantes propuestos para utilización en el hombre	34
7.1 Equilibrio entre las ventajas de los coadyuvantes y sus efectos adversos	35
7.2 Composición	35
7.3 Biodegradabilidad	36
7.4 Carcinogénesis	36
7.5 Efectos « en cascada »	36
7.6 Definición de la actividad	36
7.7 Patología	37
7.8 Efectos farmacológicos adversos	37
7.9 Estabilidad	37
8. Sugerencias para la investigación futura	37
Bibliografía	42

**GRUPO CIENTIFICO DE LA OMS SOBRE COADYUVANTES
INMUNOLOGICOS**

Ginebra, 6-10 de octubre de 1975

Miembros : *

- Profesor T. Diamantstein, Clínica Steglitz, Universidad Libre, Berlín
- Dr. M. R. Hilleman, Director, Virus and Cell Biology Research, Merck Institute of Therapeutic Research, West Point, PA, Estados Unidos de América
- Dr. J. H. Humphrey, Division of Immunology, National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra (*Presidente*)
- Dr. P. Lagrange, Hôpital Saint-Joseph, París, Francia
- Dr. I. Mota, Jefe del Centro de Investigación y Capacitación en Inmunología, OPS/OMS, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil
- Profesor O. Westphal, Director, Instituto Max Planck de Inmunología, Friburgo de Brisgovia, República Federal de Alemania
- Profesor R. G. White, Department of Bacteriology and Immunology, University of Glasgow, Western Infirmary, Glasgow, Escocia (*Relator*)

Secretaría :

- Dr. D. Dresser, National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra (*Asesor temporero*)
- Dr. J. G. Howard, Department of Experimental Immunobiology, The Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, Inglaterra (*Asesor temporero*)
- Dr. G. Torrigiani, Jefe interino, Inmunología, OMS, Ginebra, Suiza (*Secretario*)

* No pudo asistir : Profesor R. M. Fauve, Département de Biologie moléculaire, Institut Pasteur, París, Francia.

COADYUVANTES INMUNOLOGICOS

Informe de un Grupo Científico de la OMS

Del 6 al 10 de octubre de 1975 se reunió en Ginebra un Grupo Científico de la OMS sobre Coadyuvantes Inmunológicos. El Dr. D. Tejada-de-Rivero, Subdirector General, abrió la reunión en nombre del Director General.

1. INTRODUCCION

La inmunización artificial del hombre y de otros animales se practica con varias finalidades diferentes. El principal objetivo, que ya ha reportado enormes beneficios a la humanidad, es la inmunización profiláctica contra enfermedades infecciosas, en la que la inmunidad eficaz y duradera obedece a la estimulación controlada del sistema inmunitario mediante la administración de una vacuna inofensiva y no a la estimulación incontrolada por infecciones clínicas naturales. Para que la inmunización profiláctica impida la infección clínica por los microbios o parásitos que pueden ser inhibidos por anticuerpos, basta mantener una concentración apropiada de anticuerpos en la circulación y/o en las superficies mucosas, y que sea posible un rápido aumento de la formación de anticuerpos si después se produce una infección subclínica. Por lo tanto, los efectos de la inmunización profiláctica deben ser de larga duración. Por razones prácticas y económicas, la inmunización profiláctica ha de obtenerse con un número mínimo de dosis, a ser posible con una sola inyección, empleando la cantidad mínima de antígeno compatible con una inmunización eficaz. Cuando se emplean agentes no vivos, para satisfacer este requisito se necesitan ciertos medios especiales, cuyo principal ejemplo es el empleo de coadyuvantes. Estos, por definición, son sustancias que se incorporan a un antígeno o que se inyectan al mismo tiempo que éste e intensifican inespecíficamente las consiguientes respuestas inmunológicas.

Cuando los microorganismos causantes de una infección clínica no son susceptibles de inhibición por anticuerpos circulantes (sea por interacción directa o por opsonización y destrucción por fagocitos), por ejemplo, cuando los agentes causales se establecen dentro de las células, o incluso fuera de ellas, como en el caso de ciertos parásitos, para la eliminación de la infección se requiere la participación de la inmunidad

específica de base celular producida por los linfocitos. De ahí que las vacunas que provocan principal o exclusivamente producción de anticuerpos puedan ser ineficaces, y se está comprendiendo que para una inmunización profiláctica eficaz pueden requerirse procedimientos de inmunización destinados a provocar una inmunidad celular potencial duradera.

Un segundo objetivo de la inmunización artificial es obtener grandes cantidades de anticuerpos específicos para preparar antisueros terapéuticos o reactivos de diagnóstico y para determinación cuantitativa. También en este caso se utilizan mucho los coadyuvantes para lograr el aumento necesario de la producción de anticuerpos suscitada por las proteínas y otros antígenos.

Un tercer objetivo es intensificar la reacción inmunitaria contra células tumorales o células infectadas con agentes intracelulares (v.g., *Mycobacterium leprae*) que están ya en el organismo, pero contra las que no resulta suficientemente eficaz la respuesta inmunitaria natural. La inmunostimulación necesaria para la terapéutica en estos casos puede requerir que se aumente tanto la capacidad lítica inespecífica de los macrófagos como la estimulación de la inmunidad específica de base celular. También en estos casos se emplean sustancias coadyuvantes, pero con un fin terapéutico inmediato, aunque pueda producirse también una protección profiláctica a largo plazo.

En el presente informe se examinan los principios en que se basa el empleo de coadyuvantes para cada uno de estos fines, el supuesto mecanismo de acción y las posibles aplicaciones prácticas de las sustancias coadyuvantes conocidas, así como las restricciones que imponen las posibles reacciones adversas. Una sección final contiene las propuestas de nuevos trabajos que el Grupo Científico estima prometedoros. Para mayor claridad, hay que señalar que los procesos inmunitarios aquí estudiados tienen que ver principalmente con las funciones e interrelaciones de tres clases de células, que son las células T procedentes del timo, encargadas del reconocimiento del antígeno; los linfocitos procedentes de la médula ósea (células B), que actúan en combinación con las células T y se convierten en una familia de plasmacitos productores de anticuerpos; y los macrófagos.

2. PREPARACIONES COADYUVANTES PARA USO HUMANO

2.1 Coadyuvantes de depósito

Se entiende generalmente por coadyuvantes inmunológicos las sustancias que se añaden a las vacunas para potenciar la respuesta inmunológica de modo que se produzca mayor cantidad de anticuerpo, se necesite menor cantidad de antígeno y haya que administrar menos dosis. Hay dos tipos principales de los llamados *coadyuvantes de depósito*: 1) compuestos de aluminio y calcio (entre ellos el fosfato de aluminio, el hidróxido de aluminio, el óxido de aluminio y el fosfato de calcio) y 2) las emulsiones de agua en aceite, cuyos representantes más conocidos son las mezclas de agua en aceite mineral (coadyuvante incompleto de Freund) y de agua en aceite de cacahuete (Coadyuvante 65).

Los coadyuvantes a base de fosfato o hidróxido de aluminio son los utilizados desde hace más tiempo y más extensamente. Estos compuestos tienen fama de inocuidad en el hombre, aunque pueden aparecer abscesos estériles y nódulos persistentes después de su administración. Las concentraciones de anticuerpos contra los antígenos de estas vacunas son claramente superiores, aunque no mucho, a las obtenidas con las correspondientes vacunas acuosas. Esas respuestas de los anticuerpos séricos son de corta duración, aunque puede hacerse que persistan satisfactoriamente mediante la administración de dosis múltiples.

2.1.1 *Coadyuvantes de aluminio*

Cuando se inyecta por vía subcutánea en la pata de un ratón una pequeña dosis de proteína marcada radiactivamente, se observa que el 98 %-99 % de estas macromoléculas extrañas ha salido de la extremidad a las 24 horas, quedando en el ganglio linfático correspondiente sólo una ínfima fracción (32). Se puede aumentar mucho el estímulo inmunogénico frenando la salida del antígeno del lugar de la inyección y prolongando el periodo de contacto del antígeno con los macrófagos y otras células sensibles. Los antígenos precipitados con alúmina mantienen una gran concentración local de antígeno en el lugar de la inyección y lo liberan lentamente. En el ganglio linfático de drenaje se desarrollan plasmacitos productores de anticuerpos en mayor número y durante mucho más tiempo cuando se inyecta el antígeno precipitado con alúmina que cuando se inyecta la misma dosis de antígeno en solución simple (42). La mayor estimulación de los plasmacitos obedece probablemente a que los macrófagos engloban la sal de aluminio portadora del antígeno y así se obtiene

un efecto inmunogénico mayor que con la misma cantidad de antígeno soluble. También se observa una considerable dispersión de los macrófagos que contienen alúmina hacia los nódulos linfáticos regionales. Además, después de la administración del coadyuvante puede desarrollarse un granuloma local donde hay gran número de plasmacitos productores de anticuerpos, lo que contribuye a la síntesis general de anticuerpos.

Es característico que la producción de anticuerpo contra los antígenos cuando se emplean sustancias que contienen aluminio sea relativamente breve; así, la concentración de anticuerpos baja rápidamente tres o cuatro semanas después de la inyección. Del trabajo de Holt (21) se deduce claramente que, aunque el antígeno persista en el lugar de la inyección, rápidamente deja de estimular el mecanismo productor de anticuerpos, de una manera que contrasta con el efecto mucho más duradero de las mezclas coadyuvantes de agua en aceite. En parte, por los menos, esto se puede obviar repitiendo las inyecciones de vacuna. Por ejemplo, en la profilaxis de la difteria bastan dos inyecciones de antígenos precipitados con alumbre para crear en el ser humano un grado satisfactorio y duradero de inmunidad potencial.

Para que la mezcla de coadyuvante e inmunógeno sea eficaz, es indispensable que el antígeno esté realmente asociado al compuesto de aluminio. A veces la sal de aluminio se forma en presencia del antígeno, consiguiéndose así la oclusión del antígeno en el coadyuvante, pero hay que procurar que el pH se mantenga dentro de límites aceptables. Otra posibilidad es agregar al antígeno el compuesto de aluminio ya formado. En este caso, la eficacia de la acción coadyuvante depende de que el antígeno se haya adsorbido en el coadyuvante, lo que hay que comprobar.

La formación de un pequeño granuloma es inevitable cuando se emplean vacunas precipitadas con alumbre y debe considerarse como requisito de una actividad coadyuvante eficaz. Las vacunas precipitadas con alumbre deben inyectarse por vía intramuscular, ya que el granuloma que se desarrolla después de la inyección subcutánea puede necrosarse, con formación de quistes y abscesos.

2.1.2 *Coadyuvantes en emulsión de agua en aceite*

Las vacunas con coadyuvante en emulsión de agua en aceite se han empleado menos que las vacunas con coadyuvantes de alumbre. Sin embargo, serán de gran importancia en lo futuro, ya que permiten emplear dosis menores de antígeno para obtener títulos muy altos de anticuerpo y mantenerlos durante años. Además, la respuesta antigénica suele ser considerablemente más amplia, lo que, en el caso de la vacuna con virus gripal muerto, reduce la importancia del cambio continuo de

composición antigénica de las cepas prevalentes del virus gripal que con el tiempo inutiliza parcial o completamente las vacunas preparadas con cepas más antiguas.

El coadyuvante incompleto de Freund consiste en una emulsión de la vacuna acuosa en aceite mineral de baja densidad, empleando como emulsionante Arlacel A (forma impura del éster de manitol y ácido oleico). El coadyuvante completo de Freund se diferencia del anterior en que se añaden micobacterias muertas para aumentar la respuesta inflamatoria (11, 13) y es demasiado reactivo para que sea posible utilizarlo médicamente en el hombre. El Coadyuvante 65 empleado actualmente es una emulsión de vacuna acuosa en aceite de cacahuete muy refinado con monooleato de manitol químicamente puro como emulsionante y monoestearato de aluminio químicamente puro como estabilizador (17, 20).

Los coadyuvantes en emulsión de agua en aceite parecen actuar de tres maneras. Primero, en el lugar de la inyección se forma un depósito que libera lentamente el antígeno emulsionado. Segundo, la emulsión sirve para transportar el antígeno a múltiples focos de todo el sistema linfático. Tercero, se producen reacciones granulomatosas en el lugar de la inyección y en puntos focales de todo el organismo. Consisten principalmente en emulsión de aceite rodeada de células mononucleares (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) que forman « orgánulos » muy eficaces en la síntesis de anticuerpos. El papel de los macrófagos tiene especial importancia. Estos ingieren las emulsiones de aceite tanto en el lugar de la inyección como en el sistema reticuloendotelial de la zona afectada, y la cinética de la endocitosis y la digestión de la emulsión son de importancia decisiva para el resultado del proceso de inmunización y para cualquier manifestación tóxica que pudiera producirse.

Es indudable la necesidad de la gran potenciación inmunológica que confieren ambas vacunas en emulsión de agua en aceite. La principal consideración al comparar el coadyuvante de aceite mineral con el de aceite de cacahuete es la cuestión de la inocuidad relativa. Se ha criticado el coadyuvante de aceite mineral sosteniendo, entre otras cosas, que causa unos excesivos trastornos generales, que provoca diversos trastornos autoinmunitarios, y que potencia las respuestas alérgicas; se ha recalado también la escasez de datos experimentales para juzgar su inocuidad (metabolismo de los componentes del coadyuvante y estudios en animales de su toxicidad y efectos anatomopatológicos a largo plazo). Hay que señalar que muchos de los datos sobre reacciones adversas proceden de estudios realizados con otros fines y no constituyen necesariamente una base para juzgar la vacuna. En los estudios a largo plazo

en el hombre no se han encontrado efectos adversos realmente importantes. Sin embargo, el coadyuvante a base de aceite mineral, aunque esté bien preparado, de vez en cuando causa abscesos estériles y el aceite se retiene en los tejidos durante largo tiempo, probablemente toda la vida. Algunos autores estiman que esto es inaceptable.

Al estudiar los coadyuvantes en general, parece haber pocas diferencias cualitativas en las respuestas del huésped a las sustancias extrañas. En cambio, hay diferencias cuantitativas en el tipo, la duración y el grado de las reacciones individuales. Estas varían entre una reacción mínima y transitoria a las vacunas acuosas y la reacción grave y persistente al coadyuvante completo de Freund con adición de micobacterias. Conviene encontrar una fórmula que reforzara adecuadamente la inmunorreacción a los antígenos (acción coadyuvante) pero que evitara la hiperestimulación y prolongada persistencia de los componentes del coadyuvante que pueden producir efectos nocivos. El Coadyuvante 65 presenta ventajas evidentes cuando se prepara con reactivos químicamente puros, como aceite de cacahuete muy refinado, y todos sus componentes son fácilmente metabolizables. Se ha demostrado que dos meses después de la inyección el coadyuvante está casi completamente metabolizado, disminuyendo así la probabilidad de hiperestimulación inmunológica y eliminándose el problema de la persistencia duradera, que podría causar efectos nocivos. El aumento de la concentración sanguínea de anticuerpos por el Coadyuvante 65 se asemeja al obtenido con preparaciones a base de aceite mineral. Se han realizado amplios ensayos de toxicidad a corto plazo (aguda) y a largo plazo (crónica) en cobayos, ratones y monos; después de pocas o muchas inyecciones de esta preparación no se han encontrado efectos adversos importantes; tampoco se ha demostrado que la preparación sea teratogénica en el conejo. No se observó sensibilización a los componentes del coadyuvante, incluido el aceite de cacahuete. La inyección subcutánea de los componentes del Coadyuvante 65 y del coadyuvante de aceite mineral, como la de muchos otros productos medicinales, puede aumentar la incidencia de neoplasias en ciertas estirpes de ratones, especialmente en los machos. Sin embargo, prolongados estudios anatomopatológicos han demostrado que ninguna de las sustancias es cancerígena y que el efecto obedece a alteraciones fisicoquímicas bien conocidas que suelen favorecer la aparición de neoplasias en ciertos roedores y que no afectan al ser humano (14). Se han obtenido los mismos resultados mediante la inyección de agua destilada, e incluso con la punción repetida de la piel de los ratones. Estudios efectuados en seres humanos durante 18 años después de la inyección de coadyuvante de aceite mineral y durante 10 años después de la inyección de coadyu-

vante de aceite de cacahuete demostraron que no había aumentado la incidencia de neoplasias ni de otros efectos adversos de importancia clínica.

Se ha observado que es muy importante, tanto en el caso del coadyuvante de aceite mineral como en el de aceite de cacahuete, que sus componentes estén exentos de ácidos grasos libres, que el componente de vacuna acuosa esté totalmente libre de esterazas o lipasas que puedan descomponer los oleatos de manitol o el aceite de cacahuete liberando ácidos grasos. Estos son tóxicos y su presencia en el coadyuvante puede producir intensa reacción local en el músculo con formación de nódulos fluctuantes y abscesos. Este problema ha hecho que los coadyuvantes grasos sólo se empleen con vacunas de virus muerto purificado y que hasta ahora no se haya podido generalizar su aplicación a las vacunas bacterianas.

La preparación de coadyuvantes de aceite emulsionado requiere un control muy cuidadoso de los componentes y de la calidad de las emulsiones. Para el coadyuvante de aceite de cacahuete se emplea un aceite muy refinado libre de proteínas de cacahuete. Se hacen pruebas para determinar la ausencia de aflatoxina, un carcinógeno hepático que suele aparecer en el cacahuete enmohecido. Se comprueba la pureza química del monooleato de manitol y del monoestearato de aluminio, así como la ausencia de ácidos grasos libres. En los tres componentes se comprueba la ausencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (carcinógenos). También se determina su capacidad mediante ensayos apropiados en cobayos y ratones. Se comprueba la esterilidad microbiana de la vacuna acuosa y la ausencia de enzimas capaces de liberar ácidos grasos del aceite de cacahuete, del monoestearato de aluminio o del monooleato de manitol. Puede recordarse que el coadyuvante de aceite mineral ha sido empleado en estudios en el ser humano con vacunas contra el cólera, contra la fiebre tifoidea y de toxoide tetánico; se produjeron pronunciadas reacciones adversas, incluso con formación de quistes y abscesos supurantes. Se comprobó que esos efectos obedecían a la liberación de ácido oleico del manitol en el emulsionante Arlacel A, aunque también puede haber contribuido la presencia de endotoxina en las bacterias.

Se obtiene la emulsión y luego se determina la viscosidad y la estabilidad del producto durante el almacenamiento a 4°C y a elevadas temperaturas. Las emulsiones demasiado espesas pueden frenar la liberación de la sustancia en el lugar de depósito y reducir así el efecto coadyuvante. Las emulsiones demasiado fluidas pueden tener escaso efecto coadyuvante. La descomposición de la emulsión en el organismo, especialmente cuando se emplean alérgenos, puede ser sumamente peligrosa para el

sujeto. En el producto final se determina la esterilidad microbiana, la ausencia de ácidos grasos libres, y la capacidad de provocar una respuesta inflamatoria en el conejo (por ejemplo, por inyección en el músculo sacroespinal y evaluación histopatológica). Finalmente, se compara la capacidad del producto de provocar una alta concentración sérica de anticuerpos (por inyección en animales, generalmente cobayos) con la capacidad de una misma cantidad de antígeno en solución acuosa. La cantidad de anticuerpos que provoca la emulsión resulta por lo menos cuatro veces mayor ; generalmente mucho más.

Conviene administrar todos los coadyuvantes de aceite emulsionado por inyección intramuscular profunda, ya que la probabilidad de efectos adversos es mucho mayor con la inyección subcutánea. Los médicos y enfermeras que administran las vacunas con coadyuvantes de aceite emulsionado deben saber que la administración de estos productos por vía subcutánea puede causar graves reacciones adversas y que, por lo tanto, es preciso administrarlos exactamente por inyección intramuscular profunda.

Hasta ahora, las pruebas para controlar el coadyuvante de aceite mineral han sido menos completas que las empleadas con el Coadyuvante 65. Convendría que, cuando proceda, se apliquen al coadyuvante de aceite mineral pruebas destinadas a medir los mismos efectos.

Las emulsiones a base de aceite mineral se han ido modificando para mejorar su conservación, la facilidad de inyección, y la homogeneidad de las vacunas. En una de esas preparaciones, la emulsión de agua en aceite se dispersa en solución salina por medio de un agente apropiado emulsionante de aceite en agua (Tween 80) (16), a fin de obtener una emulsión del tipo llamado «de agua-en aceite-en agua». A pesar de sus evidentes posibilidades, hasta el momento este coadyuvante no se ha ensayado mucho.

2.2 Corineformas anaerobias

Diversas cepas bacterianas conocidas con la designación general de « *Corynebacterium parvum* » han mostrado una extraordinaria capacidad de estimulación del tejido linforreticular. Ha sido difícil clasificar estas bacterias, aunque es evidente que no está justificada su inclusión en el género *Corynebacterium*. Provisionalmente se ha adoptado la designación general de « corineformas anaerobias » (33) para microorganismos que puedan llegar a ser clasificados formalmente como pertenecientes al género *Propionibacterium* (22) e identificados con microorganismos hoy llamados « *Propionibacterium acnes* » y « *P. avidum* ». Se pueden emplear esas bacterias como coadyuvantes de las tres maneras siguientes :

1) Pueden añadirse a la emulsión de agua en aceite mineral. En los primeros estudios (31) realizados con esta preparación se observó aumento de la formación de anticuerpos séricos e hipersensibilidad dérmica retardada. Sin embargo, en trabajos posteriores con diferentes cepas de corineformas anaerobias se confirmó el efecto sobre la formación de anticuerpos séricos, pero no el aumento de la hipersensibilidad tardía.

2) La inyección intravenosa de una gran dosis (por ejemplo, 350 µg de bacterias, peso en seco) en solución salina (suero fisiológico) provoca en el ratón una intensa activación y proliferación de los macrófagos que dura varias semanas. En estos macrófagos aumenta la capacidad de matar bacterias (por ejemplo, *Bordetella pertussis*) y protozoos (*Plasmodium berghei* y *Trypanosoma cruzi*). Los ratones presentan también mayor resistencia a muy diversos tumores genéticamente idénticos, lo que es especialmente notable en relación con la supresión de nódulos pulmonares cuando se introducen células malignas por vía intravenosa (6). Este fenómeno se ha asociado a la actividad citostática de los macrófagos activados.

Cuando los microorganismos se inyectan en aceite mineral o solución salina, en el lugar de la inyección y en los ganglios linfáticos de drenaje se desarrolla un granuloma local. Si la inyección es intravenosa se forman granulomas miliares diseminados. El macrófago es la célula principal de esos granulomas, los cuales, a diferencia de las reacciones celulares a las micobacterias, rara vez presentan necrosis.

Si se inyectan los antígenos varios días después del *C. parvus*, y no al mismo tiempo, su efecto más notable es aumentar la producción de anticuerpos. Esto se observa con dosis inmunizantes óptimas de antígenos independientes del timo, que son refractarios a otros coadyuvantes. Tratándose de antígenos dependientes del timo y en forma de partículas, como los eritrocitos heterólogos, dosis inmunizantes mínimas aumentan la producción de inmunoglobulina M (IgM), mientras que la de inmunoglobulina G (IgG) sólo aumenta cuando se dan dosis más altas. No se encuentra actividad coadyuvante con algunos antígenos proteínicos solubles. Simultáneamente con la inmuoestimulación de la producción de anticuerpos se observa inmunosupresión de muchos aspectos de la inmunidad de base celular. Por ejemplo, se prolonga el rechazo del aloinjerto de piel, se deprime la reactividad a la fitohemaglutinina y al cultivo linfocítico mixto, aumenta la resistencia a la reacción antagónica del injerto contra el huésped y disminuye la provocación de inmunidad de las células por antígenos específicos de tumores y cloruro de picrilo. Parece que la depresión funcional de las células T es reversible y

que, por lo menos en algunos casos, depende de los macrófagos activados.

3) Recientemente se observó que la inyección de una pequeña dosis de las bacterias (v.g. 5 µg) en combinación con células tumorales irradiadas o en la vecindad de una neoplasia en crecimiento hace que aparezca inmunidad específica de las células T en el nódulo linfático regional. Actualmente se estudia hasta qué punto podría aprovecharse esto para la inmunización profiláctica con antígenos no tumorales.

Se está investigando la base molecular de la gran actividad de este grupo de bacterias. Las paredes celulares exentas de lípidos conservan todas las propiedades del microorganismo intacto, excepto la mitogenicidad. El *C. parvum* muerto posee una excepcional capacidad de subsistir dentro de los macrófagos; aunque pertenezca a una cepa relativamente inactiva, su persistencia podría potenciar el efecto de un componente activo.

Muchas bacterias corineformes anaerobias tienen propiedades quimiotácticas que atraen a los fagocitos mononucleares. Esta propiedad se puede demostrar *in vitro* en un medio libre de suero o plasma; es específica para los macrófagos y, según trabajos recientes, para los linfocitos transformados. La capacidad de producir este factor quimiotáctico está en correlación con la capacidad de las bacterias de acelerar la eliminación del carbono en los ratones y posiblemente tiene que ver con sus otros efectos inmunoestimulantes.

Se hallan actualmente en curso numerosos ensayos organizados del *C. parvum* como agente inmunoterapéutico en casos humanos de cáncer. Se emplean dosis más altas que las que se utilizarían como coadyuvante en la inmunización contra infecciones o enfermedades parasitarias. Aunque estos estudios facilitarán datos válidos respecto a las secuelas de la administración de *C. parvum* en la inmunoterapia del cáncer, quizá no sean de interés para su posible utilidad como coadyuvante.

Es preciso continuar estudiando el efecto del *C. parvum* como coadyuvante no graso administrado localmente con el antígeno.

2.3 Bacilo Calmette-Guérin

El BCG, estimulante inmunológico muy activo, es hoy el inmunoestimulante inespecífico más utilizado en medicina. Como inmunoestimulante, el BCG aumenta en el ratón la resistencia a diversas infecciones bacterianas y facilita mucho la eliminación por el sistema reticuloendotelial de las sustancias en forma de partículas; esa estimulación persiste

durante muy largo tiempo. El BCG favorece la producción de anticuerpos y aumenta el número de células esplénicas productoras de anticuerpos. También aumenta la hipersensibilidad tardía a los antígenos en partículas o solubles, acelera en el ratón el rechazo de los aloinjertos de piel y de los tumores trasplantados e inhibe la carcinogénesis. Tiende a modificar la acción de ciertos medicamentos como la ciclofosfamida (27), de modo que, por lo que se refiere a la toxicidad, el BCG puede actuar de manera sinérgica o antagónica con ciertos fármacos.

El BCG podría contribuir de dos maneras distintas a favorecer el rechazo inmunológico de los tumores o a aumentar la resistencia a la infección. La primera depende del efecto potenciador que las micobacterias ejercen sobre la respuesta inmunitaria en general. La segunda consiste en provocar hiperplasia e hiperactividad del sistema reticulo-endotelial. Esto se ha observado no sólo en animales a los que se ha inyectado BCG, sino también en sujetos con inmunidad celular que han sido expuestos deliberadamente o por inadvertencia al antígeno específico. El primer efecto del BCG serviría para aumentar la capacidad del huésped para llevar a cabo un ataque dirigido específicamente contra las células tumorales o el parásito; el segundo contribuiría a la expresión final de la resistencia creando un sistema más eficaz de eliminación de detritus. Este último efecto parece ser en la actualidad tan decisivo para favorecer la inmunidad antitumoral como para aumentar la resistencia a ciertas enfermedades infecciosas (26).

La mejor manera de estimular la inmunidad de base celular es emplear un cultivo fresco de BCG que contenga una gran proporción de bacilos vivos; el modo de preparar y preservar las suspensiones bacterianas y la elección de las cepas influyen en el efecto coadyuvante del BCG. Se ha demostrado que la actividad óptima se obtiene empleando bacterias tomadas de la película y no del cultivo sumergido. Los bacilos muertos actúan principalmente aumentando los anticuerpos circulantes.

Para evitar cualquier riesgo para el ser humano por el empleo de cepas de bacilos vivos, aunque atenuados, se ha tratado de reemplazarlos por bacterias saprofitas o por fracciones subcelulares de micobacterias (véase la sección 3.1).

2.4 Bordetella pertussis

La producción de anticuerpos causada en los roedores por cantidades habitualmente no inmunogénicas de diversos antígenos aumenta considerablemente si se inyectan al mismo tiempo bacterias muertas obtenidas de cultivos de *B. pertussis* lisos o de fase I; también se intensifica y se

prolonga la memoria de las células T y B. Si se administran a los roedores cantidades mínimas de un antígeno proteínico juntamente con los microorganismos, se estimula selectivamente la producción de IgG1 y de IgE.^a Sin embargo, si se administra el antígeno dos días después que el *B. pertussis*, la producción de anticuerpos puede disminuir.

Se sabe que el *B. pertussis* activa los macrófagos y así aumenta la eficacia de los antígenos asociados a ellos. También produce un marcado desplazamiento de linfocitos desde las zonas de células T y B de los tejidos linfoides a la circulación, al impedir el paso normal de los linfocitos a través de las vénulas postcapilares endoteliales altas, efecto que persiste durante una semana o más. Esto se atribuye a un factor en partículas estimulante de la linfocitosis (FEL), que se encuentra en los microorganismos y que se ha comprobado que se adhiere a la superficie de los linfocitos. Otros efectos son hipoglicemia transitoria y aumento de la sensibilidad a la histamina y a la 5-hidroxitriptamina que alcanza un máximo cuatro días después de la inyección pero persiste durante varias semanas.

La actividad de los lipopolisacáridos (LPS) extraídos del *B. pertussis* es semejante a la de otros tipos de LPS (véase la sección 3.2) y puede que también contribuya al efecto de este microorganismo.

Se ha demostrado que el *B. pertussis* aumenta el número de células T auxiliares y la proliferación de células B, además de activar los macrófagos. No se sabe qué componentes o propiedades de los microorganismos intervienen ni cómo influyen unos en otros. Probablemente no interviene el efecto de sensibilización histamínica. Parece probable que la acción del FEL sobre la redistribución de los linfocitos influya mucho en la inmunidad, pero no se sabe cómo podría intensificarla. El *B. pertussis* tiene también gran actividad B-adrenérgica y, en consecuencia, provoca hipersecreción de insulina, que conduce a la hipoglicemia y, si se mantiene, a grave lesión cerebral.

En el hombre, la vacuna antitosferínica administrada simultáneamente con otros agentes (toxóide tetánico, toxóide diftérico) aumenta también la producción de anticuerpos contra estos últimos (15). Sin embargo, la tendencia de la vacuna antitosferínica a provocar fiebre y convulsiones en algunos niños puede limitar en lo futuro su empleo como coadyuvante en medicina.

^a Hay diversas nomenclaturas para las inmunoglobulinas del ratón. En el presente informe utilizamos una nomenclatura análoga a la empleada para las inmunoglobulinas humanas. Esto no implica homología entre las clases de Ig del ratón y del ser humano aquí denominadas por el mismo símbolo.

3. COADYUVANTES EMPLEADOS EN ANIMALES DE LABORATORIO

3.1 Emulsiones de agua en aceite con adición de micobacterias o nocardias

El coadyuvante completo de Freund es un medio de laboratorio para obtener en los animales concentraciones muy altas de anticuerpos activos contra antígenos proteínicos (o timo-dependientes) (véase la sección 5.3). Las mezclas coadyuvantes de este tipo se preparan agregando diversas especies de micobacterias o nocardias a las emulsiones simples de agua en aceite mencionadas anteriormente. Entre las micobacterias que son eficaces en esas mezclas están *M. tuberculosis* (cepas humana y bovina), *M. avium*, *M. phlei* (cepas saprofitas), *M. smegmatis* y *M. kansasii* (cepas atípicas). Varias especies de nocardias también son eficaces: *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. rhodochronus*; esta última parece ser idéntica al « *Corynebacterium rubrum* », que se ha empleado mucho en lugar de los dos primeros de este grupo. En cambio, las auténticas cepas de *Corynebacterium*, como *C. diphtheriae* o *C. xerosis*, no son activas.

Este efecto coadyuvante, según los resultados obtenidos en el cobayo, consiste en un aumento considerable de la concentración sérica de anticuerpos que se mantiene durante varios meses. Además hay una intensificación duradera de la hipersensibilidad retardada a los diversos antígenos proteínicos incorporados (incluso los asociados a las micobacterias) y se forma un granuloma persistente, a menudo necrótico, en el lugar de la inyección. También se han añadido micobacterias a emulsiones de agua en aceite destinadas a provocar una encefalomiелitis diseminada aguda, empleándose componentes de cerebro homólogo como inmunógeno; se pueden provocar trastornos autoinmunitarios análogos contra distintos antígenos tisulares. El empleo de micobacterias origina también modificaciones cualitativas espectaculares de la producción de anticuerpos. Por ejemplo, los sueros de cobayos inmunizados tres o cuatro semanas antes con ovalbúmina en coadyuvante completo de Freund contienen considerable cantidad de anticuerpo antiovalbúmina en forma de IgG2, mientras que los testigos contienen principalmente IgG1. En este caso, las micobacterias potencian la producción de anticuerpos con propiedades de importancia biológica, tales como activación del complemento (IgG2) y afinidad por los macrófagos.

En los primeros estudios para definir el principio activo de esos efectos coadyuvantes se utilizaban extractos de micobacterias completas,

que podían obtenerse con disolventes orgánicos neutros, en especial cloroformo. Se demostró que estos extractos clorofórmicos, llamados fracción cera purificada (2), cera D (5) y, en una forma posterior purificada, peptidoglicolípido (lípido que contiene péptidos) (23, 43) reproducían en el cobayo los diversos efectos coadyuvantes de las micobacterias completas. Sin embargo, se comprobó que sólo con los extractos de las micobacterias de tipo humano se obtenía un gran rendimiento de coadyuvante de eficacia biológica y que esta eficacia estaba en correlación con la presencia, en los extractos de cepas humanas, de peptidoglicolípidos que contenían aminoácidos, D- y L-alanina, ácido D-glutámico y ácido *meso*-diaminopimélico, así como de aminoglúcidos, entre ellos ácido murámico. Todos estos elementos indicaban una semejanza con la mureína o peptidoglicán de la pared celular bacteriana. Más recientemente se han aislado « coadyuvantes hidrosolubles » de las paredes celulares de la especie *M. smegmatis* y de las bacterias completas (llamados respectivamente WSA y neo-WSA) mediante un sencillo tratamiento con lisozima (1) o simplemente con agua (29). Estos extractos, incorporados a una emulsión de agua en aceite mineral, han resultado eficaces para producir en el cobayo respuestas humorales y celulares a antígenos proteínicos, pero su actividad no es significativamente mayor (en términos ponderales) que la actividad de las paredes celulares o de las micobacterias completas. De los filtrados crudos de cultivos de micobacterias se puede obtener gran cantidad de ese peptidoglicán activo. Se han extraído peptidoglicanos análogos con actividad coadyuvante de muy diversas especies de bacterias gramnegativas y grampositivas (30). Mediante el empleo de compuestos sintéticos se ha investigado cuál es la estructura molecular mínima requerida para esa actividad coadyuvante y se ha visto que la *N*-acetil muramil-L-alanil-isoglutamina (pero no el monopéptido de muramilo) tiene actividad coadyuvante en el cobayo (37). Sigue existiendo la anomalía de que esos coadyuvantes hidrosolubles han de ser inyectados con un vehículo de aceite mineral, lo que sugiere que para comprender mejor su actividad es preciso conocer los factores fisicoquímicos que intervienen en su presentación a las células inmunocompetentes.

Es preciso añadir que incluso el famoso coadyuvante completo de Freund puede deprimir una reacción inmunológica en vez de intensificarla. Así, puede producirse una enérgica inmunosupresión cuando se administra un segundo inmunógeno tras la inyección previa de un antígeno diferente en coadyuvante completo de Freund. Esto puede tener por consecuencia prácticamente la eliminación de las respuestas de anticuerpos y de hipersensibilidad retardada al segundo antígeno. Si la dosis

de micobacterias en el coadyuvante completo de Freund es mayor que la óptima se puede inhibir el desarrollo de una encefalomiелitis alérgica experimental (36).

Los siguientes mecanismos celulares podrían explicar los efectos principales de las mezclas coadyuvantes de agua en aceite y de micobacterias o nocardias :

1) un efecto de depósito del antígeno en la emulsión de agua en aceite (12);

2) una activación general de los macrófagos por aumento específico de la actividad de las células T y por efecto directo del aceite y del componente micobacteriano ;

3) retención de poblaciones de células T en los ganglios linfáticos regionales del lugar de la inyección del coadyuvante completo de Freund (38);

4) interferencia con la segregación normal de B-linfocitos hacia los centros germinales actuando contra la homeostasis normal de la formación de anticuerpos producto del anticuerpo 7S, hipótesis basada en experiencias realizadas con pollos (41);

5) desviación de la respuesta específica a un antígeno desde la provocación de tolerancia hacia la síntesis de anticuerpos (examinada en la sección 5.1).

3.2 Lipopolisacáridos bacterianos (endotoxinas)

Cuando por diversas vías se administran a animales de laboratorio microgramos de lipopolisacáridos (LPS) obtenidos de muy distintas bacterias gramnegativas, se desencadena una gran producción precoz de anticuerpos IgM (y en algunas especies respuestas posteriores de IgG) contra los componentes polisacáridos de los LPS. La cantidad de anticuerpo es mucho mayor que la provocada por cantidades correspondientes del componente polisacárido solo. Si se administran junto con los LPS pequeñas cantidades de algún otro antígeno, la producción de anticuerpos contra estos antígenos también es mucho mayor. Por lo tanto, los LPS pueden ser considerados como coadyuvantes. También poseen una gran variedad de actividades biológicas que no tienen relación directa con su efecto sobre la reacción inmunógena : entre otras, pirogénesis, activación del plasminógeno, estimulación de la corteza suprarrenal, adherencia de polimorfonucleares y plaquetas al endotelio vascular (seguida de leucocitosis), estimulación de la síntesis hepática de proteínas (incluso properdina) de fase aguda, liberación y estímulo del inter-

ferón, y activación de la otra vía del complemento. Se supone que los LPS actúan sobre distintas células, las más importantes de las cuales serían los polimorfonucleares y los macrófagos, ya que probablemente son la fuente de factores activos secundarios (v.g., interferón, enzimas de los lisosomas, activador del plasminógeno y otras proteasas neutras, y posiblemente activadores de los linfocitos).

Toda la actividad biológica puede atribuirse a la presencia del lípido A, que existe en todos los LPS. El lípido A consta de dos moléculas de fosfato de glucosamina unidas por un enlace β (1 \rightarrow 6), a cuyos grupos amino se une un ácido mirístico; a una de las moléculas de glucosamina se unen sendas moléculas de ácidos láurico y palmítico en las posiciones 3 y 4. La estructura se puede modificar por medios químicos. El lípido A puro sufre diversos grados de polimerización en presencia de cationes bivalentes y sólo se puede estudiar con seguridad en forma de monómero (la sal de trimetilamina preparada por electrodiálisis resulta muy práctica), o de complejo con una proteína inerte, como, por ejemplo, seralbúmina bovina.

El lípido A puro es pirogénico en los primates en dosis de 0,01 μ g por kg de peso corporal, pero dosis mucho mayores no llegan a ser mortales. Por administración repetida se obtiene rápidamente tolerancia de la acción pirogénica. Normalmente, el lípido A no es inmunogénico, aunque puede provocarse la formación de anticuerpos mediante la inyección de salmónela « super rugosa » muerta, tratada de tal manera que quede recubierta exclusivamente con lípido A. En los animales y seres humanos normales no se detectan anticuerpos ni siquiera tras la recuperación de una infección enterobacteriana.

Aunque el lípido A probablemente no sirva como coadyuvante por la gran diversidad de sus efectos biológicos, es interesante porque se ha demostrado que es un energético activador de un subgrupo de linfocitos B (detectados en el bazo del ratón, del conejo o del ser humano, pero con una distribución variable en otros tejidos) que los hace diferenciarse, dividirse y segregar IgM. Esto conduce a la activación inespecífica de los linfocitos B susceptibles, independientemente de su especificidad en lo que respecta a los anticuerpos, y aumenta la proliferación de los linfocitos B ya estimulados específicamente por un antígeno distinto administrado al mismo tiempo. Se ha demostrado *in vitro* que cuando un antígeno timo-independiente está él mismo ligado al lípido A o a un LPS, éstos convergen en linfocitos específicamente sensibles al antígeno, y con dosis bajas éstos son específicamente estimulados a segregar anticuerpo IgM. Sin embargo, no se ha demostrado ningún proceso semejante que pueda explicar el efecto coadyuvante del LPS *in vivo*. El LPS, al activar los

macrófagos (véase la sección 6) y por sus otros efectos ya mencionados, podría influir indirectamente de distintas maneras sobre la reacción inmunogénica. La interpretación se complica cuando se usan *in vivo* dosis casi tóxicas de LPS, porque estimulan la corteza suprarrenal provocando lisis y depleción pasajera de linfocitos. El LPS también causa grandes alteraciones transitorias de la circulación en los tejidos linfoides, caracterizadas por un gran aumento de la microvascularidad que tiene algún parecido con las alteraciones que provocan los productos de activación de los linfocitos. Se ha observado que el LPS inhibe en el ratón la producción de anticuerpos contra algunos antígenos timo-dependientes administrados uno o dos días después. No se conoce el mecanismo de esto, ni se sabe hasta qué punto intervienen los linfocitos T, si es que intervienen.

Otra aplicación distinta de los LPS ha sido su administración a animales con tumores, por vía intravenosa o directamente en el tejido tumoral. Esto produce, entre otras cosas, una necrosis del endotelio de las frágiles vénulas intratumorales y una activación de los macrófagos; también se puede producir, directa o indirectamente, necrosis de las células tumorales. No se sabe si también se estimula la inmunidad específica basada en las células T antitumorales.

3.3 Sustancias análogas a la lisolecitina

Se han sintetizado (3) sustancias análogas a la lisolecitina (LLA) que no se metabolizan en las membranas celulares siguiendo el ciclo fosfolipídico normal que reconvierte la lisolecitina en lecitina (9). Esas sustancias no sólo tienen un periodo de semidescomposición muy prolongado, sino que pueden conservar las propiedades de actividad superficial de la lisolecitina. Se ha observado que en bajas concentraciones estas sustancias activan enérgicamente los macrófagos, facilitan la formación de puentes intercelulares y llegan incluso a causar fusión celular (35), aunque en concentraciones más altas producen lisis celular. Es posible administrar al ratón una inyección única, intraperitoneal o intravenosa, de LLA (por ejemplo, C₁₈ éter hidroxilisolecitina o C₁₂ o C₁₆ éter deoxilisolecitina) sin causar efectos tóxicos importantes, y si de uno a cuatro días después se inyectan por vía intraperitoneal pequeñas cantidades de antígenos como seralbúmina bovina o eritrocitos de carnero se registra un gran aumento de producción primaria de anticuerpos. También pueden intensificarse considerablemente las reacciones secundarias, especialmente si la primera dosis de LLA fue pequeña (1 µg). Sin embargo, para obtener una acción

coadyuvante óptima, es preciso evaluar cuidadosamente tanto las dosis de LLA y de antígeno como el momento de las inyecciones.^a

Una sola inyección intraperitoneal de alguna LLA de cadena larga administrada cuatro días antes de la inoculación de 10^4 células de tumor ascítico de Ehrlich protege a los ratones contra el tumor. Después de la inoculación de cantidades letales de diversas células tumorales, las inyecciones diarias de 10 µg de LLA, administradas por vía intravenosa (e incluso intracutánea en un lugar alejado de la inoculación de células tumorales) durante 16-20 días confirieron protección completa contra algunos tumores y protección muy considerable contra otros. Los ratones que resultaron protegidos resistieron específicamente a la administración posterior de inóculos mayores del mismo tumor. Se ha demostrado que la inyección de LLA directamente en la masa de un tumor experimental provoca la lisis de muchas de las células tumorales y luego la desaparición del resto (tal vez porque la LLA aumenta la inmunogenicidad de las membranas celulares destruidas).

Experimentos en cobayos indican que dosis intravenosas únicas mucho mayores de las que se requieren para la actividad coadyuvante no son significativamente tóxicas, y ensayos preliminares en mandriles indican también que las LLA son bien toleradas.

Las LLA, que se pueden preparar en forma pura y que ofrecen muchas posibilidades de ulterior modificación química, constituyen una nueva clase muy prometedora de coadyuvantes que merece nuevos estudios, especialmente en relación con la inmunoterapia de los tumores. Su mecanismo de acción se desconoce.

3.4 Sustancias que labilizan los lisosomas

Varias sustancias comparten la propiedad de hacer que los lisosomas dejen escapar las enzimas que contienen. Figuran entre esas sustancias la vitamina A en dosis tóxicas, las sales de berilio y las formas tóxicas de sílice, todas las cuales han mostrado actividad coadyuvante al ser administradas a roedores simultáneamente con diversos antígenos. Ciertos compuestos alquílicos cuaternarios de amonio con una longitud óptima de cadena actúan de manera semejante.

Todos activan enérgicamente los macrófagos en dosis insuficientes para matarlos y se supone (en algunos casos se ha demostrado) que a ello obedece su acción coadyuvante. No tienen interés práctico por su

^a Munder, P. G. y cols. Effects of lysolecithin and synthetic analogues on the immune response (documento inédito de la OMS, IMM/SG15/WP/75.5, 1975).

toxicidad general, pero ilustran la importancia de los macrófagos como reguladores de la respuesta inmunológica.

3.5 Polianiones

Los polianiones (40), entre ellos los ácidos polirribonucleicos de cadena doble, naturales y sintéticos (7), tienen un efecto coadyuvante que acorta el periodo de provocación e intensifica la reacción inmunógena humoral. Por ejemplo, se ha demostrado que cuando se administra el antígeno en dosis subóptimas, ciertos polianiones como el sulfato de dextrán, el poli I : C (ácido poliinosínico-policitidílico) y el poli A : U (ácido poliadenílico-poliuridílico) intensifican el efecto de numerosos antígenos timo-dependientes (aunque no el de los timo-independientes). Sin embargo, si el antígeno se inyecta dos o tres días después de la administración de los polianiones, se inhibe la reacción inmunológica. También se ha demostrado que los polianiones aumentan *in vivo* el número de las células mnemónicas. Parece que la actividad coadyuvante depende del tamaño molecular del esqueleto del polímero y de la naturaleza química de los grupos aniónicos, tales como sulfato, carboxilato y fosfato. Los polianiones pueden restablecer tanto *in vivo* como *in vitro* la capacidad de reaccionar frente a los antígenos timo-dependientes en los ratones con depleción de las células T, lo que indica que pueden actuar reemplazando o estimulando la función de esas células. En cuanto a la célula sobre la que se ejerce su acción, se ha demostrado que los polianiones suelen provocar la mitosis de los linfocitos B y probablemente también de células primitivas como los citoblastos linfoides e incluso de algunas células no linfoides. Se ha logrado activar células T auxiliares y macrófagos utilizando poli I : C o poli A : U, y se ha demostrado que el tratamiento previo de los timocitos con polímeros sulfatados estimula su reactividad a la fitohemaglutinina. Uno de los puntos que quedan por aclarar es si los polianiones afectan a la inmunidad basada en las células T o en las células K (citocidas) o si actúan exclusivamente sobre la reacción humoral. Los polianiones son compuestos sumamente reactivos que muestran diversos efectos biológicos, entre ellos estimulación del interferón, inhibición de algunos factores del complemento (C1q), activación del C3 y efecto sobre el sistema de coagulación de la sangre. Estas propiedades no parecen tener relación con su actividad coadyuvante. No parece probable que se generalice el empleo de los polianiones en el hombre, ya que son pirogénicos y algunos de sus efectos en los animales pueden ser motivo de preocupación respecto a su inocuidad, especialmente la potenciación de la enfermedad autoinmunitaria en los

ratones NZB/W; además, la mayor parte de los polianiones tienen efectos secundarios muy tóxicos.

3.6 Polisacáridos de hongos

Investigadores japoneses han estudiado la actividad antitumoral de varios polisacáridos obtenidos de hongos. Descubrieron que el lentinán, un (1→3)-β-D-glucano (polímero de la glucosa cuyo peso molecular es aproximadamente de 10⁶), inhibe el crecimiento del sarcoma 180 en ratones intactos pero no en los timentomizados (28). Esta posibilidad de que refuercen la acción de los linfocitos T en la inmunidad antitumoral se ha extendido a una potenciación de la función auxiliar de los linfocitos T. Aunque el lentinán no influye en la inmunidad contra los aloinjertos ni en la hipersensibilidad tardía, y estimula la producción de grandes cantidades de una proteína sérica todavía no identificada, en dosis relativamente grandes no es tóxico para el ratón. Es lógico seguir investigando la posible actividad coadyuvante del lentinán y sustancias afines.

3.7 Levamisol

Se ha demostrado que el levamisol, un derivado del imidazol, muy empleado como antihelmíntico, estimula la formación de anticuerpos y la regresión de tumores en ciertos animales (34) y algunos aspectos de la inmunidad celular en el ser humano (39). Todavía no se conoce su mecanismo de acción. Su posible actividad coadyuvante, así como la de otros compuestos del mismo tipo, requiere nuevas investigaciones.

4. LOS COADYUVANTES EN RELACION CON LA POSIBLE INMUNOTERAPIA DE LOS TUMORES

Diversos coadyuvantes, entre ellos el BCG, el residuo de la extracción con metanol, las corineformas anaerobias y las LLA, pueden aumentar considerablemente la resistencia de los roedores a los injertos de tumores alogénicos y singénicos. En los primeros trabajos se estudió el efecto del tratamiento con coadyuvantes previo a la introducción de células tumorales y evidentemente tenían poco interés para la aplicación terapéutica. Más recientemente varios trabajos han demostrado que se puede provocar un grado considerable de regresión tumoral mediante la inyección de ciertos coadyuvantes en la zona del tumor (v.g., corineformas anaerobias) o bien por vía general (LLA). Otra observación de interés para una

posible inmunoterapia del cáncer es que el tratamiento con BCG y corineformas anaerobias en un momento cercano al de la inyección intravenosa de células tumorales puede suprimir completamente el subsiguiente desarrollo de nódulos tumorales en los pulmones. Esta terapéutica coadyuvante podría proteger contra las metástasis provocadas durante la resección quirúrgica de una neoplasia.

Los diversos modelos experimentales se basan en más de un mecanismo. El primero representa el efecto inespecífico de los macrófagos activados por el coadyuvante, efecto que puede demostrarse que es muy citostático sobre las células tumorales *in vitro*. En el segundo interviene el desarrollo de inmunidad específica contra el tumor conferida por las células T. Puede producirse cuando se inyectan localmente corineformas anaerobias, ya sea alrededor de un tumor o junto con células tumorales letalmente irradiadas. También se desarrolla inmunidad específica contra el tumor después de la regresión provocada por LLA.

En la actualidad se llevan a cabo en bastantes países ensayos clínicos organizados de inmunoterapia del cáncer, empleando BCG y corineformas anaerobias. Además, muchos laboratorios estudian intensivamente el empleo experimental de coadyuvantes como agentes antitumorales en el ratón, esperándose obtener ciertas indicaciones para su empleo racional en el hombre.

5. POSIBLE MODO DE ACCION DE LOS COADYUVANTES SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

5.1 Efecto coadyuvante sobre la célula

En el curso del último decenio se ha visto que la respuesta inmunológica suele depender de una interacción compleja del antígeno con uno o más tipos de célula. En el Cuadro 1 se esquematiza la posibilidad de que el contacto con el antígeno pueda suscitar, en diversos tipos de linfocitos, uno u otro de dos estados inmunológicos que se excluyen recíprocamente (inmunidad y tolerancia). Se supone que los coadyuvantes pueden actuar sobre uno o varios de los tipos celulares enumerados y que en las distintas situaciones en que se observa inmunopotenciación funcional podría haber estimulación de diversas combinaciones de esos tipos de células.

Distintas sustancias con propiedades coadyuvantes definidas empíricamente podrían estimular cualquiera de las diversas funciones de los macrófagos en la respuesta inmunológica. Figuran, entre ellas :

- 1) la producción de antígeno elaborado con mayor inmunogenicidad ;
- 2) la eliminación del exceso de antígeno, protegiendo así al animal contra la provocación de tolerancia ;
- 3) la presentación a los linfocitos del antígeno fijado a su membrana superficial en forma más conveniente, más prolongada, o ambas a la vez ;
- 4) la actuación como reservorios celulares de antígeno, que puede ser liberado durante un largo periodo (en ello está implícito que la estimulación repetida por el antígeno durante un periodo prolongado producirá una concentración de anticuerpos mayor que la obtenida con una sola exposición); y
- 5) síntesis y liberación de un factor (inespecífico) activador y/o inhibidor de los linfocitos.

CUADRO 1. INMUNIDAD O TOLERANCIA SUSCITADA POR EL ANTIGENO EN DISTINTOS TIPOS DE CELULA

Consecuencia de la administración de antígeno	Células que intervienen en la reacción o « silenciadas » en la tolerancia	
	Sistema reticulo-endotelial (inespecífico)	Linfocitos (específico)
1) Hay reacción	Macrófagos (diversos)	Linfocitos T (inmunidad de base celular, auxiliares, supresores)
2) No hay reacción		
a) nada		
b) tolerancia	—	Linfocitos B (de diversas clases)

Como el coadyuvante completo de Freund (véase la sección 3.1), muchos coadyuvantes y complejos inmunes potencian la retención de linfocitos circulantes en los órganos linfoides de drenaje. Este mecanismo, en el que puede intervenir la estimulación de ciertos macrófagos especializados (células del revestimiento endotelial de los senos linfáticos), aumenta la probabilidad de un contacto eficaz entre el antígeno y todos los protagonistas celulares necesarios para la reacción inmunológica.

El antígeno, ya sea directamente o después de su paso por los macrófagos, puede desencadenar cambios en las poblaciones linfocitarias que llevan a un estado de tolerancia o bien de inmunidad. Hay algunos modelos de sistemas razonablemente definidos en los que un aspecto importante de la acción coadyuvante es desviar células de una vía que lleva a la tolerancia a otra que conduce a diferenciaciones inmunogénicas. Tanto

la acción coadyuvante como la provocación de tolerancia pueden desarrollarse a través de cualquiera de los subtipos de linfocitos enumerados en el Cuadro 2 o de cualquier combinación de ellos.

CUADRO 2. ACCION SELECTIVA DE ALGUNOS COADYUVANTES SOBRE DISTINTOS TIPOS DE CELULAS

Tipo celular (efecto primario)	Coadyuvantes	
T (inmunidad de base celular)	hipersensibilidad retardada	levamisol
	aloinjerto	BCG, <i>C. parvum</i>
	« inmunidad »	BCG, <i>C. parvum</i>
T (auxiliar)	Poli A, poli U; lentinán; <i>B. pertussis</i>	
T (supresor)	<i>B. pertussis</i>	
T (citocida)	dudoso	
B (clase μ)	escaso efecto	} LPS; polianiones (incluso polinucleótidos)
B (clase γ)	gran efecto	
Macrófago	<i>C. parvum</i> ; <i>B. pertussis</i> , labilizantes de los lisosomas, sales de aluminio, polinucleótidos	
Células citocidas (citólisis dependiente de los anticuerpos)	dudoso	

La diferenciación celular es un fenómeno que depende del tiempo y no hay duda ninguna de que por lo menos algunos de sus mecanismos intervienen en la diferenciación inmunológica. Tiene por ello cierto interés e importancia el hecho de que los efectos estimulantes e inhibidores de los coadyuvantes y de los métodos de inmunosupresión dependan del momento de su administración (y de su dosis) en relación con la del antígeno. Por ejemplo, si se inyectan LPS 24 horas antes que el antígeno, pueden ejercer un gran efecto supresor, mientras que si se administran simultáneamente o muy poco tiempo después pueden potenciar la inmunidad. Convendría explorar un mecanismo teóricamente posible en el caso de ciertos coadyuvantes y según el cual éstos actúan como inhibidores selectivos de las células T reguladoras (supresoras) que son normalmente estimuladas por la administración de un antígeno. Se han descrito en el pollo (41) mecanismos reguladores en los que intervienen productos de las células B (anticuerpos) que son estimulados por el coadyuvante de Freund (véase la sección 3.1).

En resumen, se supone que los coadyuvantes pueden actuar sobre las células en una o más de las tres formas siguientes :

1) ayudando a los linfocitos a « decidir » diferenciarse por la vía inmunógena y no por la de tolerancia ;

2) amplificando la proliferación « post-decisión » de los linfocitos inmunoinducidos (ya sea directamente o por medio de factores estimu-

lantes liberados por los macrófagos) con lo que aumentaría la magnitud de las consiguientes clonas de células productoras de anticuerpos ; y

3) aumentando la capacidad de los macrófagos de almacenar y conservar el antígeno en la medida en que se prolonga el estímulo específico, fomentando así la proliferación « post-decisión » por una vía distinta de la señalada en el párrafo 2 *supra*.

Este último punto subraya la importancia que pueden tener los macrófagos intermediarios en muchos de los casos de inducción inmunógena.

5.2 Efecto de los coadyuvantes sobre las clases de anticuerpos

Muchos coadyuvantes provocan preferentemente la síntesis de una o varias clases de anticuerpos. La puesta en marcha de la clase de anticuerpos IgE depende especialmente del tipo de coadyuvante que se emplee para estimular la respuesta primaria. Tanto el *B. pertussis* como las partículas de $Al(OH)_3$ sobre las cuales se adsorbe el antígeno son coadyuvantes muy eficaces para promover la síntesis de anticuerpos IgE en conejos y otros roedores. Por otra parte, el coadyuvante completo de Freund favorece la síntesis de anticuerpos IgG en la mayoría de las especies. Los ratones inmunizados con una combinación de antígeno timo-dependiente, como seralbúmina humana y *B. pertussis*, producen más IgG1 e IgG2b que IgG2a. Los cobayos inmunizados con coadyuvante completo de Freund producen anticuerpos IgG1 e IgG2, mientras que los mismos animales, estimulados con el coadyuvante incompleto de Freund, producen casi únicamente anticuerpos IgG1. La inmunización intraperitoneal del conejo con antígeno precipitado con alumbre favorece la producción de anticuerpos IgE, mientras que la inmunización con coadyuvante completo de Freund aumenta la de IgG.

5.3 Efecto de los coadyuvantes sobre la afinidad de los anticuerpos

Se ha observado que la acción de pequeñas cantidades de antígeno durante largo tiempo (como en el caso del coadyuvante completo de Freund) estimula la producción de anticuerpos contra cualquier determinante dado, cuya afinidad media aumenta así con el tiempo (10). Si el antígeno es una molécula compleja y posee varios determinantes distintos, se intensifica la avidez de los anticuerpos, medida, por ejemplo, por la capacidad de un antisuero de formar con el antígeno complejos indisolubles. El aumento de la avidez se explica en parte por la producción de anticuerpos contra más determinantes a medida que se prolonga la

estimulación. La afinidad varía en los anticuerpos de la clase IgG y sólo en menor grado en los de la clase IgM (8).

El aumento de la afinidad media de los anticuerpos obedece a la estimulación preferencial de los linfocitos de la población de células B sensibles al antígeno que tienen mayor afinidad por los determinantes antigénicos. Esa estimulación se va haciendo cada vez más selectiva una vez que se ha producido el anticuerpo de gran afinidad capaz de formar un complejo con el antígeno residual e impedirle que estimule las células B cuyos receptores tienen menor afinidad. Cuando se emplean grandes dosis de antígeno, con o sin coadyuvante, para suscitar una producción primaria de anticuerpos, hay una selección mínima de células de gran afinidad y predominan los anticuerpos de escasa afinidad; una nueva estimulación también produce sobre todo anticuerpos de poca afinidad. El antígeno en pequeñas dosis, sin coadyuvante, puede ser incapaz de estimular y mantener una respuesta de suficiente intensidad o duración para que se desarrolle un proceso selectivo. De ahí que si se desea producir anticuerpo de gran afinidad la mejor manera de lograrlo es administrar cantidades mínimas de antígeno en una forma persistente junto con un coadyuvante energético y persistente.

5.4 Coadyuvancia

La experiencia corriente indica que los antígenos extraños, administrados al ser humano o a los animales de laboratorio en su estado nativo, difieren mucho unos de otros en la facilidad con que provocan la formación de anticuerpos. Algunos tienden a provocar una indiferencia inmunológica específica, mientras que otros pueden provocar reacciones de variable duración e intensidad, con producción de clases distintas de anticuerpos y mayor o menor grado de memoria inmunológica, mientras que otros son prácticamente ineficaces. Se ha empleado el término coadyuvancia para describir las propiedades que, sumándose a la presencia de grupos determinantes inmunológicos extraños (epítomos), permiten a un antígeno provocar la formación de anticuerpos. El término es cómodo, aunque más que explicar el mecanismo de acción describe cierta actividad coadyuvante propia. El estudio de ciertos antígenos que son inmunógenos muy activos hace pensar que la coadyuvancia puede incluir varios atributos diferentes, como los que se enumeran a continuación, cuya relación con los complejos factores que regulan la respuesta inmunógena puede verse consultando la sección 5.1.

1) La posesión de muchos epítomos distintos de configuraciones estables, de modo que la población de células B y T potencialmente

reactivas es relativamente numerosa. Distribución de los epítomos que les permita fijarse en muchos puntos a los receptores linfocitarios. Presencia de epítomos capaces de reacción cruzada con antígenos a los cuales el receptor ya ha sido inmunizado y, por lo tanto, aumento de la reserva potencialmente reactiva de células B o de células auxiliares T o de ambas clases de células.

2) La posesión de receptores para los determinantes en los linfocitos, en los macrófagos o en ambos tipos de células, que permitan al antígeno fijarse a los linfocitos reactivos por lazos adicionales a los que proporcionan los receptores específicos de los determinantes antigénicos. Se podría citar como ejemplo las exotoxinas bacterianas (v.g., cólera y tétanos) que se unen a los gangliósidos; las moléculas que fijan C3b o exponen los determinantes Fc; los complejos que contienen lípido A; las lectinas y toxinas vegetales.

3) La capacidad de estimular los linfocitos B, T o ambos tipos de células para que se diferencien y se dividan, aunque los antígenos no interactúen con estas células a través de receptores específicos (activación policlonal).

4) La posibilidad de captación por los macrófagos y retención de las moléculas del antígeno en la superficie durante largo tiempo en forma accesible a los linfocitos.

5) La capacidad de hacer que los macrófagos liberen factores de activación de los linfocitos (véase la sección 6).

6) La estabilidad química frente a las enzimas de los humores corporales.

7) Un tamaño molecular que impida su rápida excreción de los órganos linfoides del animal. El tamaño molecular también tiene importancia para la multiplicidad de los epítomos, la captación por los macrófagos, y en relación con otros factores que no es fácil definir.

En la medida en que sea posible identificar las características de la coadyuvancia, se podrá, teóricamente, conferirles a un determinado antígeno para aumentar su inmunogenicidad. Esto ya se ha hecho, por ejemplo, en la unión covalente de pequeñas hormonas peptídicas o grupos hidrocarbonados a polipéptidos sintéticos u otras moléculas portadoras (v.g., toxoide tetánico) para hacer que se formen anticuerpos contra los grupos ligados, y también en la formación de complejos iónicos no covalentes de inmunógenos débiles con seralbúmina bovina metilada.

5.5 Los coadyuvantes en la provocación de inmunidad de base celular

Durante las infecciones crónicas (generalmente por patógenos intracelulares), y después del transplante de tejidos alogénicos, normales o malignos, suele desarrollarse una fuerte inmunidad de base celular. En cambio, después de la inmunización activa ordinaria en que sólo se emplean antígenos solubles o en partículas, habitualmente no se detecta inmunidad de base celular, aunque en realidad ésta se desarrolla, incluso como reacción a la inyección intravenosa de eritrocitos de carnero, si se usan dosis suficientemente pequeñas (25). Sin embargo, la reacción es sólo transitoria y muy sensible al exceso de antígeno. En el mecanismo que impide la persistencia de la inmunidad de base celular después de la inmunización sin coadyuvante intervendría una retroinhibición por complejos antígeno-anticuerpo. Así, la supresión del componente humoral de la reacción inmunológica mediante ciclofosfamida o esplenectomía aumenta y prolonga considerablemente la inmunidad de base celular a los eritrocitos de carnero (25). Según otra hipótesis, la desaparición de la inmunidad de base celular después de dosis mayores de antígeno obedecería a la generación de células supresoras, papel que se ha atribuido tanto a las células B como a las T (4, 24).

Para provocar inmunidad de base celular por inmunización activa todavía se emplean sólo unos pocos coadyuvantes : cepas de micobacterias y corineformas anaerobias (o fracciones de las mismas) incorporadas a una emulsión grasa de tipo Freund o administradas solas. No se sabe qué propiedad especial de estas sustancias les permite amplificar la inmunidad de base celular, ya que habitualmente también potencian la reacción humoral. Mackaness y cols. (27) trabajaron con *M. tuberculosis* viable (cepa BCG) y concluyeron que el mecanismo probablemente consiste en una eficaz eliminación de los complejos antígeno-anticuerpo por estímulo del sistema reticuloendotelial combinada con un aumento de la producción de células T activadas. (Tanto el BCG como el *C. parvum* estimulan de manera intensa y prolongada el sistema reticuloendotelial y es probable que actúen al principio directamente sobre los macrófagos y luego a través de la interacción con células T específicamente activadas.)

5.5.1 Coadyuvantes de agua en aceite

La manera más corriente de provocar hipersensibilidad retardada es la incorporación del antígeno en coadyuvante completo de Freund. En lugar de *M. tuberculosis* (véase la sección 3.1) se pueden emplear diversas bacterias, o algunos microgramos de peptidoglicán bacteriano, aunque sea en su forma monómera. Todavía no se ha explorado la posibilidad de

utilizar Coadyuvante 65 en la provocación experimental de inmunidad de base celular.

5.5.2 *Coadyuvantes de micobacterias y corineformas sin aceite*

Si se administra a los roedores una inyección intravenosa de *M. tuberculosis* (BCG) viable o de un extracto metanólico de su pared celular, de 7 a 14 días después se suele observar un aumento de la reacción de base celular. Esto ha sido demostrado mediante la provocación de hipersensibilidad retardada a las proteínas y a sus conjugados hapténicos de inmunidad específica a células tumorales e isoinjertos, y de rechazo de aloinjertos de piel. Se ha comprobado en estas condiciones la formación de linfocitos T citotóxicos.

Se ha observado que la inyección local de cantidades muy pequeñas de *C. parvum* (hasta un 1 % de la dosis intravenosa) juntamente con células tumorales irradiadas provoca una fuerte inmunidad de base celular que es específica y protectora. Se estudia ahora la posibilidad de aprovechar esta propiedad para emplear el *C. parvum* como coadyuvante de otras manifestaciones de la inmunidad celular. Tiene la ventaja de evitar las secuelas indeseables de las altas dosis : granulomas, hiperplasia linfóide, aumento de la sensibilidad a las endotoxinas y riesgo posible de enfermedad autoinmunitaria.

5.5.3 *Inhibición por los coadyuvantes de la inmunidad de base celular*

Una propiedad que parecen compartir el coadyuvante completo de Freund, el BCG, el residuo de la extracción por metanol y las corineformas anaerobias, y que se observa continuamente en muy distintas situaciones, es la tendencia a inhibir, en vez de intensificar, la inmunidad de base celular. Se pueden citar los ejemplos siguientes :

1) La inyección previa del coadyuvante completo de Freund solo atenúa la subsiguiente provocación de hipersensibilidad retardada y favorece la multiplicación de las células del hepatoma singénico. Incorporando antígeno al coadyuvante completo de Freund con fines de inmunización se ha retardado el rechazo del aloinjerto, tanto de piel como de tumores.

2) El tratamiento previo con BCG, si se repite, retrasa el rechazo del aloinjerto de piel en vez de acelerarlo. Los ratones híbridos F₁ tratados con BCG tienen mayor resistencia a la reacción del injerto contra el huésped. En la rata, la inyección de BCG facilita el crecimiento de un tumor singénico ya implantado.

3) El tratamiento previo con grandes dosis del residuo de extracción con metanol puede favorecer el crecimiento de tumores transplantados

en lugar de inhibirlo. Parece que esto no sucede si el tratamiento previo se combina con inmunización antitumoral específica.

4) Hay muchos informes sobre los efectos supresores de las corineformas anaerobias. El tratamiento previo de los ratones con la vacuna prolonga la retención de un injerto dérmico H-2 histoincompatible, aumenta la resistencia a la reacción del injerto contra el huésped, deprime la reactividad a la fitohemaglutinina y los cultivos linfocíticos mixtos, frena la provocación de inmunidad de base celular por antígenos tumorales específicos e inhibe la provocación de hipersensibilidad retardada mediante cloruro de picrilo.

No parece probable que todas estas observaciones sean manifestación de un solo mecanismo. En algunos casos se ha demostrado la intensificación por factores bloqueantes séricos, mientras que en otros este mecanismo no explica la depresión de la citotoxicidad de base celular demostrable *in vitro*. El análisis de algunos de los fenómenos provocados por el *C. parvum in vitro* revela que la presencia de macrófagos muy activados inhibe reversiblemente las funciones de las células T. No se sabe hasta qué punto se podría generalizar esta explicación, aunque las indicaciones prácticas son bastante claras. En casi todos los ejemplos de supresión de la inmunidad de base celular por cualquiera de los coadyuvantes se han empleado dosis relativamente altas, se han administrado los coadyuvantes varios días, o incluso semanas, antes que el estímulo antigénico, o se han combinado ambos procedimientos. Hay que evitar esas prácticas en los programas de inmunización.

6. ACTIVACION DE LOS MACROFAGOS

Cuando llegan a los tejidos partículas extrañas, son englobadas tanto por los micrófagos (granulocitos) como por los macrófagos. Estos últimos permanecen durante mucho más tiempo que los granulocitos en las reacciones que se producen en el sitio de una infección prolongada o de una invasión por células alogénicas o singénicas (neoplasia o aloinjerto normal), por lo que llaman la atención preferente del inmunólogo. Durante una reacción inflamatoria local causada, por ejemplo, por un coadyuvante, la mayor parte de los macrófagos se deriva de monocitos sanguíneos invasores, aunque también puede haber multiplicación local de los macrófagos de los tejidos. La mayor parte del material ingerido, incluyendo las bacterias, se desintegra rápidamente en los fagolisosomas, aunque en la superficie de los macrófagos se pueden retener canti-

dades importantes de ese material en forma macromolecular, actuando allí como potentes inmunógenos. Los macrófagos obtenidos de animales recientemente inyectados tienen una mayor capacidad de matar y digerir esos bacilos ingeridos. Se entiende por « activación » el conjunto de adaptaciones celulares que se producen ; requiere la síntesis de grandes cantidades de enzimas lisosómicas y otras mediante un proceso endotérmico que puede dar distintos productos finales. La comparación *in vitro* con macrófagos peritoneales no estimulados obtenidos de cobayos normales da los siguientes indicadores del proceso de activación :

1) aumento de la capacidad de adhesión al vidrio y al plástico y de aplanarse y extenderse sobre esa superficie como una delgada capa citoplasmática ;

2) aumento del movimiento ondulante de membrana ;

3) aumento de la oxidación de la glucosa por la vía del monofosfato de hexosa ;

4) aumento del número de gránulos intracitoplásmicos (los lisosomas) y aumento concomitante de las hidrolasas ácidas (β -glucuronidasa, catepsina D, fosfatasa ácida de la lisozima, etc.) ; y

5) liberación de factores que pueden inhibir la división celular y de otros factores que estimulan la mitosis de los linfocitos.

El desarrollo de estas propiedades en los macrófagos se puede activar por medios específicos e inespecíficos. Entre los primeros figuran el reconocimiento antigénico específico por los linfocitos T y la estimulación de éstos, así como la estimulación de los macrófagos resultante de la liberación del respectivo factor de activación (linfocinas). Se puede completar este proceso de activación en 24 horas si se provoca mediante la adición de linfocitos sensibilizados y antígeno homólogo sobre una capa unicelular de macrófagos.

7. FACTORES ESPECIALES QUE HAN DE TENERSE EN CUENTA AL EVALUAR LA IDONEIDAD E INOCUIDAD DE LOS COADYUVANTES PROPUESTOS PARA UTILIZACION EN EL HOMBRE

Desgraciadamente, no hay pautas específicas para evaluar la inocuidad de las preparaciones coadyuvantes de posible empleo en el hombre. No

bastan las pruebas corrientes de toxicidad aguda y crónica empleadas para determinar la inocuidad de los medicamentos antes de su ensayo clínico. Es preciso juzgar cada caso guiándose por los tipos de efectos adversos que se han observado durante los ensayos de los coadyuvantes de depósito (véase la sección 2.1) y en el curso de ensayos ordinarios de toxicidad aguda y crónica como los que habitualmente se llevan a cabo en animales de laboratorio en el caso de los medicamentos. A continuación se enumeran varios factores que se debería investigar experimentalmente antes de proponer el empleo de un coadyuvante en el ser humano.

7.1 Equilibrio entre las ventajas de los coadyuvantes y sus efectos adversos

Quizá la observación inicial más importante respecto a cualquier producto que se proponga como coadyuvante sea el grado de potenciación inmunógena que produce. Una potenciación como la producida por el coadyuvante completo de Freund puede ser intolerablemente excesiva y causar reacciones de hipersensibilidad dirigidas contra los propios tejidos del huésped, posiblemente con amiloidosis. Por otra parte, no vale la pena estudiar una sustancia que no produzca un grado suficiente de inmunopotenciación. Los coadyuvantes de utilidad práctica evitarían esos dos extremos siendo de máxima eficacia en la potenciación inmunógena, pero sin que la hiperestimulación llegue a causar graves efectos adversos.

7.2 Composición

Las sustancias que se empleen como coadyuvantes deben ser químicamente puras y de composición química definida o por lo menos reproducible. Deben estar exentas de carcinógenos químicos y de sustancias contaminantes que puedan provocar reacciones adversas. Así, por ejemplo, hay que eliminar los hidrocarburos policíclicos del aceite mineral ligero que se emplea en el coadyuvante incompleto de Freund ; la vacuna acuosa que se incorpora a los coadyuvantes a base de aceite emulsionado debe estar libre de bacterias y de enzimas y endotoxinas bacterianas. Además, los antígenos y el coadyuvante mismo no deben contener antígenos que den reacción cruzada con los de origen humano ni antígenos tisulares humanos que den reacción cruzada y que pudieran originar fenómenos autoinmunitarios como glomerulonefritis o encefalomiелitis alérgica. Finalmente, las sustancias empleadas en los coadyuvantes no deben por sí mismas causar hipersensibilización alérgica a los componentes del coadyuvante.

7.3 Biodegradabilidad

Lo ideal sería que los componentes del coadyuvante fueran fácilmente biodegradables, es decir, que pudieran eliminarse en pocos meses del lugar de la inyección y del organismo en general, de modo que se evitaran los efectos siguientes :

- 1) irritación prolongada capaz de lesionar los tejidos ;
- 2) hiperestimulación del sistema inmunitario ;
- 3) excesiva acumulación de productos, como la que se produce cuando el copolímero del pirano se reúne en los megacariocitos, originando depleción de plaquetas ; y
- 4) posible carcinogénesis por los efectos de « irritación » prolongada.

7.4 Carcinogénesis

Los productos químicos empleados en el coadyuvante no deben ser carcinógenos ni tampoco cocarcinógenos como lo son ciertos agentes tensoactivos. Por otra parte, no se debe confundir la acción cancerígena con el aumento de la incidencia de tumores provocado en los roedores por una gran variedad de los inyectables que se han descrito en la sección 2.1.

7.5 Efectos « en cascada »

Un coadyuvante satisfactorio para uso general debe producir un mínimo de efectos inmunoestimulantes y provocar una inmunopotenciación conveniente sin la serie de fenómenos inmunológicos diversos que puede acarrear, por ejemplo, el empleo de ácido poliinosínico-policitidílico. Esta sustancia estimula la producción no sólo de anticuerpos sino también de factores como el interferón liberado por la activación de los linfocitos ; es sustancia pirogénica y puede originar una cascada de fenómenos que conduzcan a efectos adversos inaceptables.

7.6 Definición de la actividad

Las clases de inmunoestimulación producidas por los coadyuvantes deben medirse y valorarse en relación con el fin que se persigue. Por ejemplo, la producción de anticuerpos contra ciertos antígenos tumorales puede bloquear la acción de los linfocitos en la inmunidad de base celular y así favorecer el desarrollo de los tumores en vez de impedirlo.

7.7 Patología

Las determinaciones de la toxicidad aguda y crónica de los nuevos coadyuvantes inmunológicos propuestos deben realizarse en estudios controlados con administración tanto local como general del coadyuvante y con inyección tanto única como múltiple. Además, si el coadyuvante ha de emplearse en mujeres en edad de procrear, hay que estudiar sus posibles efectos teratogénicos.

7.8 Efectos farmacológicos adversos

Deben llevarse a cabo ensayos en animales para detectar, en la medida de lo posible, cualquier efecto farmacológico adverso. Un ejemplo ilustrativo es la observada actividad β -adrenérgica del coadyuvante a base de *B. pertussis* que provoca hiperinsulinemia e hipoglicemia (véase la sección 2.4).

7.9 Estabilidad

Para tener utilidad clínica, las vacunas que contienen coadyuvantes deben poder conservarse durante por lo menos 12 a 18 meses sin perder su actividad coadyuvante y sin adquirir propiedades que provoquen mayores reacciones adversas. Además, esas preparaciones deben estar exentas de contaminantes microbianos viables.

8. SUGERENCIAS PARA LA INVESTIGACION FUTURA

La investigación futura en materia de coadyuvantes se puede dividir en dos sectores que dependen principalmente del factor tiempo. Uno de esos sectores es *técnico*: ¿qué conocimientos y técnicas existentes se pueden aplicar ya o en un porvenir próximo? El otro es *básico*: ¿qué datos y conocimiento de los mecanismos inmunitarios es posible adquirir para producir con mayor exactitud el efecto específico deseado y para obtener sustancias más inocuas y eficaces?

En cuanto a las consideraciones prácticas, hay que señalar que ya existen coadyuvantes de depósito inocuos y eficaces y que su aplicación puede extenderse. Es fundamental para su empleo la necesidad de garantizar su inocuidad, y esto depende a su vez en gran medida de la clase o clases de inmunógeno con que se desee administrar el coadyuvante. Por ejemplo, puede ser muy conveniente emplear antígenos parciales de bacterias o virus y dirigir la inmunogénesis específicamente contra

determinados antígenos porque suscitar reacciones inmunitarias contra ciertos antígenos del microorganismo completo podría resultar nocivo. La aplicación futura del coadyuvante de aceite emulsionado a las vacunas bacterianas depende de que se pueda extraer o eliminar las enzimas que descomponen los ésteres grasos liberando ácidos grasos, y retirar las endotoxinas que pudieran promover una reacción más violenta. Por razones de este orden, para emplear los coadyuvantes con vacunas de virus muertos es indispensable eliminar de estas vacunas las bacterias y los productos bacterianos y farmacológicos.

En el sector teórico y básico, lo esencial para el progreso puede estar en la definición precisa de las acciones e interacciones de los tres tipos de células que intervienen en la reacción inmunitaria, para lo cual convendría estudiar los temas siguientes : los macrófagos, los linfocitos B y los linfocitos T. Esto, a su vez, puede depender de : *a*) la aclaración del mecanismo de diferenciación de las células T y B y de la manera en que los órganos reguladores centrales (timo y equivalente de la bolsa) mantienen la diferenciación de los linfocitos; y *b*) el descubrimiento y definición de todos los productos de las células B y T por medio de los cuales éstas pueden comunicarse y regular sus interacciones y dirigir las actividades de otros tipos de células. Así, por ejemplo, sería instructivo aislar y purificar sustancias tales como la hormona del timo y las linfocinas de las células T, especialmente el factor de transferencia, el interferón y el factor inhibidor de la migración, y definir sus efectos principales. Respecto a las células B, sería importante aclarar los factores y mecanismos que intervienen en la regulación por retroalimentación en la producción de anticuerpos y en la regulación de la función de las células B por las células T. Aislados y purificados, los factores de regulación (por ejemplo, factor del timo, interferón y factor de transferencia) encontrarían aplicación clínica inmediata y la determinación de la secuencia y la síntesis de las sustancias activas purificadas será indispensable para la aplicación práctica en medicina clínica.

Una consideración muy práctica de gran importancia en la investigación básica sería encontrar la manera de separar y dirigir las reacciones a los antígenos por parte de las células T y no de las células B, y viceversa. Por ejemplo, en el cáncer, los anticuerpos bloqueantes o los complejos antígeno-anticuerpo pueden anular el efecto de la inmunidad basada en las células T. Otra necesidad muy importante sería la elaboración de métodos, quizá por procedimientos inmunológicos, para eliminar anticuerpos bloqueantes o complejos antígeno-anticuerpo que pudieran tener importancia en la inmunidad contra el cáncer y en las enfermedades por complejo inmune, como, por ejemplo, artritis y enfermedades del

hígado, del sistema cardiovascular (depósitos en el revestimiento endotelial) y del riñón (glomerulonefritis).

Conviene señalar aquí que una manera importante de modificar la reactividad del sistema inmunitario es administrar antígenos (vacunas) y que la eficacia de muchos de ellos depende del empleo de coadyuvantes inmunológicos.

A continuación se formulan sugerencias más concretas para futuros trabajos sobre coadyuvantes :

1) Muchos coadyuvantes actúan por estimulación de los macrófagos, y la eficacia de los coadyuvantes de depósito está relacionada con la formación de granulomas. Se sabe que los macrófagos activados liberan enzimas, interferón y otros factores que pueden estimular o inhibir la mitosis de los linfocitos. Hay que estudiar mejor el proceso de activación de los macrófagos y las actividades bioquímicas de los macrófagos en sus diversas formas (por ejemplo, macrófagos libres, histiocitos y células epitelioides), así como los factores que actúan sobre los linfocitos y sobre los macrófagos mismos, para comprender el papel que desempeña la activación de los macrófagos en la inmunopotenciación.

2) Hay ya pruebas convincentes de que, en las reacciones inmunológicas específicas a los antígenos dependientes del timo, los linfocitos T pueden actuar como células auxiliares, reconociendo al « portador » y cooperando con los linfocitos B para estimular la formación de anticuerpos contra ciertos epítomos, o como células inhibidoras que impiden específicamente esa estimulación de los linfocitos B. Si predominan las células inhibidoras, se produce como resultado una falta específica de respuesta. No se sabe si las sustancias coadyuvantes alteran selectivamente el equilibrio entre las células T inhibidoras y las auxiliares. En el ratón, estas células pueden diferenciarse, y por lo tanto estudiarse, porque las primeras poseen antígenos superficiales Ly 1 y las segundas Ly 2, 3. Sería muy útil encontrar marcadores de las células T inhibidoras y auxiliares en el hombre.

3) Deben fomentarse las investigaciones encaminadas a lograr la unión de sustancias de actividad coadyuvante conocida con antígenos específicos, esperando que el coadyuvante sea dirigido por el antígeno de tal manera que se aumente selectivamente la respuesta de los linfocitos sensibles al antígeno, ya sea para producir anticuerpos o inmunidad de base celular.

4) Aunque las emulsiones de depósito (de agua en aceite) biodegradables son preferibles a las sustancias no degradables, pueden sufrir

hidrólisis por las enzimas existentes en el antígeno añadido, originándose así la liberación en el espacio extracelular de ácidos grasos libres que producen una inflamación local inaceptable. Deben fomentarse por ello trabajos con los siguientes fines : *a*) descubrir un medio de eliminar o inactivar las correspondientes enzimas (v.g., lipasas) sin que se pierdan las propiedades antigénicas deseables ; y *b*) descubrir otros aceites, emulsionantes y estabilizantes biodegradables cuyos productos de descomposición no provoquen reacciones inflamatorias excesivas.

5) Deben determinarse las posibilidades de la administración de antígenos en liposomas de diversa composición que contengan aditivos coadyuvantes (v.g., peptidoglicán) y determinar su eficacia por comparación directa con su administración en agua en emulsión en aceite biodegradable.

6) Se necesita más información sobre el empleo en animales de pequeñas dosis de bacterias corineformes, inyectadas localmente con el antígeno y sin aceite. Su actividad coadyuvante en esta forma ha de compararse con la de la fracción metanólica de micobacterias, y la de la fracción hidrosoluble de nocardias.

7) Se propone el empleo de diversos ratones inmunodeficientes, como los ratones « desnudos » y los NZB, para investigar la posibilidad de combatir por medio de coadyuvantes ciertos estados de inmunodeficiencia específicos. Quizá fuera posible estudiar las metástasis de tumores con un sistema experimental de ese tipo.

8) Se señala la posibilidad de estudiar experimentalmente el empleo de coadyuvantes para la inmunopotenciación en las diversas formas clínicas de la lepra (lepromatosa y tuberculoide). Por ejemplo, un experimento inicial podría consistir en el empleo de microorganismos corineformes anaerobios, que se ha visto que poseen la capacidad específica de estimular la quimiotaxis en los macrófagos, y determinar sus efectos tras la inyección local en las lesiones cutáneas de casos de lepra. El experimento determinaría la capacidad de las corineformas anaerobias para resolver la lesión por invasión de macrófagos activados y quizá por una estimulación de la inmunidad de base celular.

9) Sería conveniente llevar a cabo las siguientes actividades : *a*) introducir medicamentos atóxicos y no inmunógenos pero de actividad coadyuvante conocida — v. g., SP 54^B, sulfato de pentosano — en emulsión de agua en aceite, por ejemplo para lograr la potenciación de la vacunación antivírica ; *b*) buscar coadyuvantes que actúen exclusivamente

(o al menos de modo predominante) sobre la inmunidad de base celular o sobre la inmunidad humoral ; c) determinar las condiciones en que los coadyuvantes conocidos, combinados con medicamentos, pueden fomentar de modo preferente la inmunidad de base celular o la humoral ; d) determinar si los coadyuvantes pueden actuar sobre las células T reguladoras ; y e) buscar compuestos que puedan modular el mecanismo de « señalización » intracelular que lleva a la maduración de las células derivadas del timo, convirtiéndolas en células T funcionalmente maduras (que intervienen en las reacciones de inmunidad humoral o de base celular).

BIBLIOGRAFIA

1. ADAM, A. Y COLS. *Infection and immunity*, **7**: 855 (1972).
2. ANDERSON, R. J. Y COLS. *Journal of biological chemistry*, **121**: 669 (1937).
3. ARNOLD, D. Y COLS. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **709**: 234 (1967).
4. ASKENASE, P. W. Y COLS. *Journal of experimental medicine*, **141**: 697 (1975).
5. ASSELINEAU, J. Y COLS. *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, **40**: 1953 (1958).
6. BOMFORD, R. Y OLIVOTTO, M. *International journal of cancer*, **14**: 226 (1974).
7. BRAUN, W. Y COLS. *En*: PLESCIA, O. & BRAUN, W., ed., *Nucleic acids in immunology*, Nueva York, Springer, 1968, pág. 347.
8. BULLOCK, W. N. Y MÖLLER, E. *Transplantation reviews*, **18**: 3 (1974).
9. DEENEN, L. L. M. VAN Y HAAS, G. H. DE *Annual review of biochemistry*, **35**: 157 (1966).
10. EISEN, H. N. Y SISKIND, G. W. *Biochemistry*, **3**: 996 (1964).
11. FREUND, J. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **68**: 609 (1948).
12. FREUND, J. *En*: PAPPENHEIMER, A. M., ed., *Nature and significance of the antibody response*. Nueva York, Columbia University Press, 1953, pág. 46.
13. FREUND, J. *Advances in tuberculosis research*, **7**: 130 (1956).
14. GOLDBERG, L. *Food and cosmetics toxicology*, **9**: 65 (1971).
15. GREENBERG, L. Y FLEMING, D. S. *Canadian journal of public health*, **38**: 279 (1947).
16. HERBERT, W. J. *En*: WEIR, D. M., ed., *Handbook of experimental immunology*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967, pág. 1207.
17. HILLEMANN, M. R. *Progress in medical virology*, **8**: 131 (1966).
18. HILLEMANN, M. R. *Annals of allergy*, **30**: 152 (1972).
19. HILLEMANN, M. R. *Annals of allergy*, **30**: 477 (1972).
20. HILLEMANN, M. R. *Symposia series in immunological standardization*, **22**: 107 (1973).
21. HOLT, L. B. *Developments in diphtheria prophylaxis*, Londres, Heinemann, 1950.
22. JOHNSON, J. L. Y CUMMINS, C. S. *Journal of bacteriology*, **109**: 1047 (1972).
23. JOLLÉS, P. Y COLS. *Archives of biochemistry*, suppl. 1: 283 (1962).
24. KATZ, S. I. Y COLS. *Nature*, **248**: 612 (1974).
25. LAGRANGE, P. H. Y COLS. *Journal of experimental medicine*, **139**: 528 (1974).
26. MACKANESS, G. B. *Journal of experimental medicine*, **129**: 973 (1969).
27. MACKANESS, G. B. Y COLS. *Journal of experimental medicine*, **139**: 1540 (1974).
28. MAEDA, Y. Y. Y COLS. *En*: WOLSTENHOLME, G. E. W. & KNIGHT, J., ed., *Immunopotential*, Amsterdam, Elsevier, 1973, pág. 259 (Ciba Foundation Symposium, New series No. 18).

29. MIGLIORE-SAMOUR, D. Y JOLLÉS, P. *FEBS letters*, **35** : 317 (1973).
 30. NAUCIEL, C. Y COLS. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences*, **277** : 2841 (1974).
 31. NEVEU, T. Y COLS. *Annales de l'Institut Pasteur*, **106** : 771 (1964).
 32. NOSSAL, G. J. V. Y ADA, G. L. Antigenes, lymphoid cells, and the immune response, Nueva York y Londres, Academic Press, 1971.
 33. O'NEILL, G. J. Y COLS. *Immunology*, **24** : 977 (1973).
 34. RENOUX, G. Y RENOUX, M. *Nature : New biology*, **246** : 217 (1972).
 35. SELLIN, D. Y COLS. *European journal of immunology*, **4** : 189 (1974).
 36. SHAW, C. Y COLS. *Journal of experimental medicine* **115** : 169 (1962).
 37. SINAÏ, P. Y MERCER, C. *Biochemical and biophysical research communications*, **59** : 1317 (1974).
 38. TAUB, R. N. Y COLS. *Immunology*, **18** : 171 (1970).
 39. TRIPODI, D. Y COLS. *New England journal of medicine*, **289** : 354 (1973).
 40. VOGT, W. R. Y COLS. *European journal of immunology*, **3** : 493 (1973).
 41. WHITE, R. G. En: WOLSTENHOLME, G. E. W. & KNIGHT, J., ed., Immunopotential, Amsterdam, Elsevier, 1973, pág. 47 (Ciba Foundation Symposium, New series No. 18).
 42. WHITE, R. G. Y COLS. *Journal of experimental medicine*, **102** : 83 (1955).
 43. WHITE, R. G. Y COLS. *Immunology*, **7** : 158 (1964).
-

**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
SERIE DE INFORMES TECNICOS**

Informes recientes :

Nº	Fr. s.
555 (1974) El uso de mercurio y compuestos alternativos en el tratamiento de semillas Informe de una Reunión Conjunta FAO/OMS en 1974 (34 páginas)	5,—
556 (1974) Investigación de fármacos causantes de dependencia en los humores orgánicos Informe de una reunión de investigadores organizada por la OMS (54 páginas)	5,—
557 (1974) Evaluación de ciertos aditivos alimentarios 18º informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (40 páginas)	5,—
558 (1974) Enfermería y salud de la comunidad Informe de un Comité de Expertos de la OMS (31 páginas)	4,—
559 (1974) Nuevas perspectivas de la estadística sanitaria Informe de la Segunda Conferencia Internacional de Comisiones Nacionales de Estadística Demográfica y Sanitaria (43 páginas)	5,—
560 (1975) Evaluación por métodos químicos y bioquímicos de los peligros de los plaguicidas para el hombre Informe de un Grupo Científico de la OMS (26 páginas)	6,—
561 (1975) Ecología de los vectores y lucha antivectorial 21º informe del Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas (39 páginas)	6,—
562 (1975) Servicios para urgencias cardiovasculares Informe de un Comité de Expertos de la OMS (138 páginas)	10,—
563 (1975) Pautas para la evaluación de los medicamentos destinados al hombre Informe de un Grupo Científico de la OMS (65 páginas)	7,—
564 (1975) Organización de servicios de salud mental en los países en desarrollo 16º informe del Comité de Expertos de la OMS en Salud Mental (40 páginas)	6,—
565 (1975) Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos 26º informe (78 páginas)	7,—
566 (1975) Planificación de escuelas de medicina Informe de un Grupo de Estudio de la OMS (46 páginas)	6,—
567 (1975) Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas 25º informe (120 páginas)	9,—
568 (1975) Consecuencias del tabaco para la salud Informe de un Comité de Expertos de la OMS (110 páginas)	9,—
569 (1975) Evaluación de las actividades de planificación de la familia en los servicios de salud Informe de un Comité de Expertos de la OMS (75 páginas)	7,—
570 (1975) Hepatitis vírica Informe de una reunión de la OMS (56 páginas)	7,—