

Respuesta inmune ante la vacuna Heberbiovac-HB en crías de rata con crecimiento intrauterino retardado

Immune response to Heberbiovac-HB vaccine in offsprings of rats with intrauterine growth retardation

Selma Susel Selva Silva¹, Orlando Tomé López¹, Yainé Cruz Alvarez¹.

Instituto Superior de Ciencias Básicas y Pre Clínicas "Victoria de Girón". La Habana. CUBA.

RESUMEN

Nos propusimos cuantificar la intensidad de la respuesta inmune a la vacuna Heberbiovac-HB en crías de ratas normales y con CIUR, se usaron dos esquemas de tratamiento, un grupo en los días 0-5-10 y otro en los días 0-11-22. Siete días después de la última dosis se realizó una extracción de sangre y se cuantificó el título de anticuerpos en cada cría. Los resultados muestran que el 100 % de las crías vacunadas con el esquema 0-11-22 seroconvirtieron contra el 87.5 % en el esquema 0-5-10, además se demostró que el grupo control del esquema 0-11-22 obtuvo un porcentaje mayor de animales en la categoría de hiperrespondedores. Se concluye que la respuesta inmune en ambos grupos tiene intensidad suficiente para levantar títulos de anticuerpos y que las crías donde se aplica el esquema 0-11-22 responden con más intensidad que las del esquema 0-5-10.

Palabras clave: respuesta inmune/ vacuna Heberbiovac-HB/ crecimiento intrauterino retardado/ bajo peso al nacer

SUMMARY

We proposed to quantify the intensity of the immune response to the Heberbiovac-HB vaccine in offsprings of normal rats and with IUGR. Two treatment schemes were used, a group at 0-5-10 days, and another at 0-11-22 days. Seven days after the last dose, blood was extracted and the antibody titer was quantified in each offspring. The results showed that 100 % of the offsprings vaccinated with the

scheme 0-11-22 seroconverted compared with 87.5 % in the scheme 0-5-10. It was also proved that that the control group of the scheme 0-11-22 attained a higher percent of animals in the category of hyperresponders. It was concluded that the immune response in both groups have sufficient intensity to rise antibody titers, and that the offsprings under the scheme 0-11-22 respond with more intensity than those of the scheme 0-5-10.

Key words: Immune response, Heberbiovac-HB vaccine, intrauterine growth retardation, low birth weight.

INTRODUCCION

El Crecimiento Intrauterino Retardado (CIUR) constituye un problema de salud con un gran impacto en la morbi-mortalidad durante los primeros años de la vida, aún cuando se hacen grandes esfuerzos por disminuir su incidencia. Aproximadamente la cuarta parte de los niños con bajo peso al nacer son portadores de un retardo en el crecimiento intrauterino, lo que los expone a daños a corto, mediano y largo plazo en el crecimiento, el desarrollo y en su adaptación a la vida social.^{1, 2}

El peso al nacer es una expresión del crecimiento y desarrollo durante la vida prenatal y además se relaciona con el alcance de una madurez orgánica y funcional que garantiza una adaptación a las condiciones de la vida extrauterina, integrándose de forma morfofuncional el sistema inmune con otros sistemas como el nervioso, el endocrino y el digestivo.³

El retardo del crecimiento intrauterino provoca un aumento de la morbilidad perinatal por asfixia intraparto, acidosis metabólica y aspiración de meconio y de la morbilidad neonatal por hipoglicemia, hipocalcemia, hipotermia y policitemia.⁴ La adaptación fisiológica postnatal y la maduración de los niños con CIUR es menor que la de los infantes normales;⁵ en los que tienen retardo en el crecimiento existe riesgo de daño intelectual, neurológico y mayor frecuencia de parálisis cerebral,⁶ así como riesgo de muerte súbita en el lactante.⁷

La desnutrición intrauterina constituye un factor de riesgo significativo para el desarrollo en la vida adulta de enfermedades crónicas no transmisibles como hipertensión arterial, diabetes, accidentes vasculares encefálicos y muerte por enfermedad coronaria,^{2,8-10} además aumenta la susceptibilidad para padecer enfermedades transmisibles sobre todo virales. Evidencias recientes han demostrado que la función inmunológica de los recién nacidos con CIUR puede estar disminuida en forma similar a la observada en niños mayores con desnutrición postnatal.^{11,12}

En la evaluación de la respuesta inmune en la vacuna cubana Heberbiovac HB se han realizado estudios en biomodelos de ratas Sprague Dawley¹³ y Ratones BALB-C,¹⁴ utilizando siempre animales adultos o en etapas posteriores al destete y sin alteraciones conocidas, esto ha permitido entre otras cosas establecer esquemas de vacunación apropiados. Sin embargo, no se ha encontrado en la literatura estudios en edades tempranas de la vida postnatal o en animales que sean portadores de algún tipo de dificultad en su desarrollo.

Los recién nacidos con retardo del crecimiento intrauterino presentan una disminución del número de células T circulantes y disminución de la respuesta linfocitaria.^{15,16} Esta deficiencia de la inmunidad celular podría estar relacionada con la mayor susceptibilidad a las infecciones virales observadas en estos niños en la vida postnatal inmediata y tardía. La capacidad de responder a antígenos extraños se adquiere antes del nacimiento. Las células B y T están presentes en el

feto desde la semana 14 de la gestación.^{15,17} La alta incidencia de infecciones en el recién nacido y mucho más en el prematuro refleja la inmadurez de su sistema inmunológico.¹⁷

Hoy en día los niños prematuros deben vacunarse a los 2 meses del nacimiento, independientemente del peso y de su edad gestacional y deben seguir el mismo calendario de los niños a término. En general, estos niños responden a las diferentes inmunizaciones con una baja reactividad y con títulos más bajos frente a los diferentes antígenos que los niños a término, aunque las tasas de seroprotección superen el 90%.¹⁷ Los grandes prematuros (extremadamente prematuros) responden a las inmunizaciones de forma adecuada, influyendo en esto sus condiciones clínicas particulares. En la respuesta a la formación de anticuerpos (Acs) frente a la vacuna de la Hepatitis B probablemente influya más la edad postnatal que el peso.¹⁷

El Sistema de Salud en Cuba brinda una especial atención al cuidado y preservación de la salud infantil, para ello desarrolla un grupo de programas dirigidos fundamentalmente a la prevención de algunas enfermedades. El programa de vacunación comienza en el hospital antes de las 24 horas del nacimiento y se extiende hasta la atención primaria de salud donde las organizaciones de masas desempeñan un rol fundamental en su cumplimiento.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la intensidad de la respuesta inmune a la vacuna cubana Heberbiovac-HB en crías de ratas con CIUR y normales, usando dos esquemas de tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en ratas de la línea Sprague Dawley, se utilizaron 30 ratas adultas jóvenes y vírgenes, con una edad promedio de 12 semanas de nacidas, cuyo peso aproximado osciló entre 180 y 200 gr., procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y 12 machos adultos, con un peso de 200 a 270 gr. de la misma línea y procedencia.

Las hembras y machos fueron mantenidos en condiciones convencionales, teniendo libre acceso al agua y al alimento, manteniendo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. El apareamiento se realiza en horas de la tarde a razón de una hembra por macho, se comprobó la cópula mediante lavado vaginal con suero fisiológico, tomándose la presencia de espermatozoides en la lámina como día cero de la gestación.

Las hembras gestadas fueron pesadas y distribuidas al azar en dos grupos: Experimental (Grupo I) de 20 ratas y Control (Grupo II), conformado por 10 madres, todas fueron colocadas en cajas individuales. Se realizó esta distribución teniendo en cuenta que las madres del Grupo Control debían aportar mayor cantidad de crías al estudio que las del Grupo Experimental.

A las madres del Grupo I se les practicó una intervención quirúrgica el día 16 de la gestación previa anestesia con éter y en condiciones asépticas; se realizó la ligadura de la arteria uterina, siguiendo el modelo descrito por Alfonso y colaboradores.¹⁸ Las madres del Grupo II no fueron intervenidas y se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las del Grupo I. En ambos grupos las ratas fueron pesadas en días alternos durante la gestación. El parto se produjo de forma fisiológica en todas las gestantes. En el Grupo Control se le dejó a cada madre, 8 crías seleccionadas al azar con vistas a garantizar la nutrición postnatal de acuerdo con lo establecido internacionalmente para esta etapa de la vida; mientras que en el Grupo Experimental cada madre crió a su camada completa, que fue siempre

menor a 8.

Las crías de ambos grupos, control (C) y experimental (E) fueron subdivididas en dos subgrupos y todas recibieron el inmunógeno Heberbiovac HB.

- SUB-GRUPO "C1": Grupo de ratas recién nacidas normales (n=40), que se les aplicó un esquema de vacunación en el primero, quinto y décimo día después del nacimiento, a razón de 0,2 ml, equivalente a 4 µg, de la vacuna cubana Heberbiovac HB por vía intraperitoneal.

- SUB-GRUPO "E1": Grupo de ratas recién nacidas con CIUR (n=40), que se les aplicó un esquema de vacunación en el primero, quinto y décimo día después del nacimiento, a razón de 0,2 ml, equivalente a 4 µg, de la vacuna cubana Heberbiovac HB por vía intraperitoneal.

- SUB-GRUPO "C2": Grupo de ratas recién nacidas normales (n=40), que se les aplicó un esquema de vacunación en el primero, décimoprimer y vigésimosegundo día después del nacimiento, a razón de 0,2 ml, equivalente a 4 µg, de la vacuna cubana Heberbiovac HB por vía intraperitoneal.

- SUB-GRUPO "E2": Grupo de ratas recién nacidas con CIUR (n=40), que se les aplicó un esquema de vacunación en el primero, décimoprimer y vigésimosegundo día después del nacimiento, a razón de 0,2 ml, equivalente a 4 µg, de la vacuna cubana Heberbiovac HB por vía intraperitoneal.

Siete días después de la última dosis a todas las crías se les realizó una extracción de sangre por el seno retroorbitario con un capilar heparinizado, depositándose en un vial de 3 ml. Posteriormente se practicó eutanasia de las crías y madres por el método indirecto.

La sangre obtenida se incubó a 37°C durante una hora, hasta su coagulación y una vez retraído el coágulo, se centrifugó durante tres minutos a 9000 rpm (750 gravedades) y se decantó el suero. Los sueros se conservaron a -20° C hasta su estudio.

Para cuantificar la intensidad de la respuesta inmune, se determinaron las concentraciones de anti-AgsHB mediante un método inmunoenzimático heterogéneo basado en el principio sandwich de doble antígeno. La bivalencia de los Acs presentes en las muestras permitió que estos se fijaran al antígeno de fase sólida y los marcados con la enzima, lo que produjo una reacción coloreada de amarillo al adicionar un substrato específico cuya intensidad es proporcional a la concentración de anti-AgsHB presentes en las muestras. El límite de detección exigido para este ensayo, fue de 4 UI/L.

La respuesta anti-AgsHB se midió por la presencia en el suero de Acs dirigidos contra la proteína principal de la cubierta externa del virus de la Hepatitis B. Esta respuesta se clasifica teniendo en cuenta las concentraciones de Acs en las siguientes categorías:

- Seroconversión: Presencia de Acss por encima del límite de detección del ensayo.
- Seroprotección: Entre 10-100 UI/L.
- Hiper-respuesta: Mayor de 100 UI/L.
- Hipo-respuesta: Menor de 10 UI/L

Se calcularon intervalos de confianza para la diferencia de medias entre grupos

independientes (CIUR y controles), con respecto a la variable inmunológica en los dos esquemas utilizados.

RESULTADOS

El análisis cuantitativo de la respuesta inmune a la vacuna Heberbiovac HB se muestra en la [tabla 1](#), donde se observa que todos los animales inmunizados con el esquema 0-11-22 seroconvierten mientras con el otro esquema 10 animales no lo logran.

El análisis cualitativo de la respuesta inmune según las categorías estudiadas, al usarse el esquema 0-5-10 se muestra en la [tabla 2](#), mientras en la [tabla 3](#) se recogen estos resultados cuando se usa el esquema 0-11-22. Con el esquema 0-5-10 no todas las crías fueron capaces de levantar una respuesta adecuada, mientras con el esquema 0-11-22 todos los animales respondieron a la vacuna con seroprotección o hiperrespuesta.

DISCUSIÓN

El éxito de una vacunación en lo que respecta a protección es que la respuesta sea intensa y duradera. De forma general a los individuos, y en este caso los animales, vacunados se les considera mejor protegidos, mientras más elevados sean los valores de Acs por encima del límite aceptado como protector.¹⁹

La edad biológica es directamente proporcional a la intensidad de la respuesta inmune,¹⁹ hecho que puede explicar porque cuando se utiliza el esquema 0-5-10 no todos los animales muestran niveles de seroconversión, mientras que los que son vacunados con el esquema 0-11-22 al tener una mayor edad tienen un mayor porcentaje de animales que seroconvierten.

Cuando se analiza la respuesta encontrada en cada grupo con ambos esquemas se observa que las mejores respuestas se obtienen con el esquema de 0-11-22, lo que indica que los animales respondieron mejor cuando el intervalo entre las dosis es mayor. Mientras más edad tienen las crías, mejor y mayor respuesta son capaces de levantar, debido a que al nacimiento el sistema inmune es inmaduro, por lo que la respuesta inmune se caracteriza por una lenta cinética de inducción, baja magnitud e intensidad, corta persistencia y baja avidéz; por lo cual es en esta etapa de la vida que los infantes son más susceptibles a muchas enfermedades virales y bacterianas.²⁰⁻²²

El hecho que no se hayan observado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos hace pensar que la calidad de la respuesta inmune está relacionada más con la edad gestacional que con el peso, factor que se invoca como condición en la maduración inmunológica.²³

Aún cuando la calidad de la respuesta del Grupo Control es moderadamente superior a la del Grupo Experimental es válido reconocer que éste último también mostró una buena respuesta en ambos esquemas, pues la casi totalidad de las crías levantaron títulos de Acs adecuadamente, lo que indica que a pesar de tener un retardo en el crecimiento intrauterino pudieron responder acertadamente a la vacuna. Estudios realizados en humanos reportan que la mayoría de los niños pretérminos responden bien a la vacuna de la Hepatitis B y desarrollan niveles de Acs protectores.²⁴

No encontramos estudios experimentales en animales con bajo peso al nacer lo cual sería de mucha utilidad para confrontar nuestros resultados, ni siquiera estudios realizados en las primeras semanas de vida, los estudios experimentales que se reportan son en roedores con edades superiores a los 21 días, pero ninguno en

períodos anteriores al destete, entre otras causas por lo difícil que resulta el manejo de los animales en este período y las dificultades para realizar las extracciones de sangre debido fundamentalmente al volumen total de sangre de estos animales en esa etapa.

El hecho que el recién nacido humano es inmunodeficiente y que los diversos mecanismos defensivos del huésped funcionan en forma subóptima es ineludible, la polémica radica en que algunos autores plantean que esta inmunodeficiencia sea en niños con CIUR o bajo peso por pretérmino y otros afirman que indistintamente de ese factor de riesgo asociado, la inmunodeficiencia del recién nacido tenga la misma severidad.

CONCLUSIONES

- La respuesta inmune en ambos grupos estudiados, tiene intensidad suficiente para levantar títulos de Acs capaces de protegerlos contra la Hepatitis B.
- Las crías donde se aplica un esquema largo (0-11-22) responden con más intensidad que las del esquema corto (0-5-10).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias G, Torres MR, Pérez N, Milián M. Factores prenatales relacionados con la prematuridad. Rev Cub Pediatr 2001; 73:11-5.
2. Peraza G, Pérez SC, Figueroa ZA. Factores asociados al bajo peso al nacer. Rev Cub Med Gen Integr 2001; 17: 490-6.
3. Carlson BM. Embriología Humana y Biología del desarrollo 2000; 444-5.
4. Peleg DM, Kennedy C, Hunter SK. Intrauterine growth restriction: Identification and management. J Obstetric Gynecol 1998; 159:1303-8.
5. Jackson JA, Wailoo MP, Peterson SA. Early physiological development of infants with intrauterine growth retardation. Arch Dis Child Fetal Neonatal 2004; 89:46-50.
6. Schwartz JE, Kovach A, Meyer J, McConnell C. Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague- Dawley rats. Biol Neonate 1998; 73:313-9.
7. Castro M, Sánchez IL, Medina C, Padrón R. Evolución del niño con bajo peso al nacer en su primer año de vida. MEDISAN 2000; 4:20-6.
8. Chang JH, Rutledge J, Stoops D. Hypobaric hipoxia induced intrauterine growth retardation. Biol Neonate 1994; 46:10-3.
9. Álvarez R, Urra LR, Aliño M. Repercusión de los factores de riesgo en el bajo peso al nacer. RESUMED 2001; 14:115-21.
10. Haggard C, Bauer MK. Rodent model of intrauterine growth restriction. Scand J Lab Anim Sci 2001; 28 (1)
11. McCance KL, Huether S. Pathophysiology and The biological basis of disease in adults and children 1998. 3rd Ed. Mosby:43-4.

12. Fanaroff A. Enfermedades del feto y del recién nacido. Ed. Científico-Técnica, La Habana 1985; 1: 75-111.
13. Malherbe JT. Efectos del consumo de etanol e inoculación de vacunas Heberbiovac HB sobre el sistema inmune y el hígado de ratas adolescentes machos. Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. Tesis para optar por el título de especialista de primer grado en Histología; Ciudad Habana 2003.
14. González V, González A, Ramírez V, Alerm A. Inmunogenicidad de la vacuna Cubana Recombinante Heberbiovac HB en modelos experimentales y aplicados al humano. Rev Cub Invest Biomed 2000; 19(1): 33-42.
15. Fanaroff A. Neonatal- perinatal medicine disease of the fetus and infant 1997. 6th Ed. Mosby: 111-21.
16. Salleras L. Vacunaciones preventivas. Principio y aplicaciones. Barcelona Masson. 2001; 578-9.
17. Omeñaca T. Vacunaciones en niños prematuros. Muchas preguntas, pocas respuestas 2003.
18. Alfonso C, Tomé O. Obtención experimental de crías con crecimiento intrauterino retardado. Rev Cub Cienc Vet 2000; 26(1): 39-41.
19. Alerm A. Respuesta post vacunal y persistencia de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis B en niños asmáticos y no asmáticos vacunados con Heberbiovac HB. Rev Cub Med Trop 1997; 49 (3): 188-92.
20. Englund J, Glezen WP, Piedra PA. Maternal immunization against viral disease. Vaccine 2000; 16 (14/15): 1456-63.
21. Gendrel D, Lenoble D, Massamba MB, Picaud A, Moreno JL, Gendrel C, et al. Placental transfer of tetanus antibodies and protection of newborn infants. Arch Fr Pediatr 1999 Dec; 47 (10): 725-9.
22. Simister NE. Placental transport of inmunoglobulin G. Vaccine 2003; 21: 3365-9.
23. Saliou P, Ajjan N, Guérin N. Efficacy and tolerance of vaccinations in premature infant. Arch Pediatr 2002 Jun; 9 (6): 629-37.
24. Belloni C, Chirico G, Pistorio A, Orsolini P, Tinelli C, Rondini G. Immunogenicity of Hepatitis B vaccine in term and preterm infants. Acta Pediatr 1998 Oct; 87(10): 1100-1.

Recibido: 15 de octubre del 2007.

Aprobado: 25 de octubre del 2007.

Tabla 1. Seroconversión por grupos según esquema de vacunación.

Grupos	0-5-10	0-11-22
Control	33 (82.5 %)	40 (100%)
Experimental	37 (92.5 %)	40 (100%)

Chi=46.09 p=0.000 n= 40

Tabla 2. Análisis cualitativo de la respuesta inmune, cuando se utiliza el esquema 0-5-10.

Grupo	Hiporespuesta	Seroprotección	Hiperrespuesta
Control	16 (40%)	17 (42.5%)	-
Experimental	7 (17.5%)	28 (70.0%)	2 (5.0%)

Chi=10.75 p=0.114 n= 40

Tabla 3. Análisis cualitativo de la respuesta inmune, cuando se utiliza el esquema 0-11-22.

Grupo	Hiporespuesta	Seroprotección	Hiperrespuesta
Control	-	27 (67.5%)	13 (32.5%)
Experimental	-	33 (82.5%)	7 (17.5%)

Chi=2.429 p=0.119 n= 40