



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Estrategias en
el diseño de vacunas para
enfermedades producidas por virus**
**Strategies in the design of vaccines for viral
diseases**

Autora: Dña. Marina Cantolla Nates

Director/es: D. Manuel Ignacio González-Carreró López

Santander, Junio 2019

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1 INTRODUCCIÓN	5
PANORAMA HISTÓRICO DE LAS VACUNAS	
2 INTERACCIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON LOS VIRUS.....	9
2.1 SISTEMA INMUNE INNATO.....	10
2.2 SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.....	12
3 ESTRATEGIAS EN EL DISEÑO DE VACUNAS DIRIGIDAS CONTRA VIRUS.....	14
3.1 VACUNAS VIVAS ATENUADAS	14
3.2 VACUNAS INACTIVADAS	18
3.2.1 MICROORGANISMO INACTIVADO	18
3.2.2 COMPONENTES PURIFICADOS: PROTEINAS, PÉPTIDOS Y POLISACÁRIDOS	18
3.3 VACUNAS “GENÉTICAS” (BASADAS EN ADN Y ARN)	20
3.3.1 VACUNAS DE ADN	20
3.3.2 VACUNAS DE ARN	25
3.4 ADYUVANTES	26
3.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES.....	28
3.4.2 ADYUVANTES UTILIZADOS EN VACUNAS AUTORIZADAS	29
3.4.3 CAPACIDAD ADYUVANTE DE LOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	32
3.4.4 ADYUVANTES UTILIZADOS EN VACUNAS BASADAS EN PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS (VLPs)	33
3.4.5 VENTAJAS DEL USO DE ADYUVANTES VACUNALES	35
4 VACUNAS FRENTE A VIRUS ALTAMENTE MUTABLES	36
4.1 VACUNAS CONTRA LA GRIPE	36
4.2 DESARROLLO DE VACUNAS EXPERIMENTALES CONTRA EL VIH.....	39

5	VIRUS EMERGENTES	40
5.1	VIRUS DEL ÉBOLA.....	40
5.2	VIRUS ZIKA	42
6.	EL FUTURO DE LA INMUNIZACIÓN.....	45
6.1	IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ANTÍGENOS PROTECTORES.	45
6.2	ADQUISICIÓN Y POTENCIACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA VACUNA .	47
6.3	DESARROLLO DE NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.	48
	CONCLUSIÓN.....	49
	BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

Las primeras vacunas fueron desarrolladas empíricamente mediante técnicas convencionales de atenuación e inactivación. Sin embargo, estos métodos clásicos presentaban numerosas limitaciones. A finales del siglo XX, gracias a los avances en biología molecular e ingeniería genética, surgió la tecnología del ADN recombinante, que permite el diseño racional de nuevos antígenos vacunales. De este modo se desarrollaron las primeras vacunas basadas en proteínas y vectores recombinantes, y las vacunas de ADN y ARN, entre otras. Estas nuevas técnicas de producción ofrecen una mayor versatilidad en el diseño del antígeno, creando vacunas más eficaces, seguras, estables y asequibles económicamente. Para aumentar su eficacia, se han desarrollado formulaciones mejoradas que incluyen nuevos adyuvantes capaces de mejorar la respuesta inmune del hospedador. Las vacunas de diseño no solo permiten emplear nuevas formas de administración con mejores resultados, sino que además su formulación hace innecesaria la cadena de frío, lo que facilitaría su uso en países en vías de desarrollo. A pesar de estos avances, persisten retos importantes. Uno de los más evidentes es el desarrollo de vacunas frente a virus con elevada tasa mutacional, lo cual incrementa la posibilidad de aparición de especies emergentes.

ABSTRACT

First vaccines were developed empirically by conventional attenuation and inactivation techniques. However, these classical methods presented numerous limitations. At the end of the 20th century, thanks to advances in molecular biology and genetic engineering, recombinant DNA technology emerged, allowing the rational design of new vaccine antigens. In this way, the first vaccines based on proteins and recombinant vectors, and DNA and RNA vaccines, among others, were developed. These new production techniques offer greater versatility in antigen design, creating more effective, safe, stable and economically affordable vaccines. To increase its effectiveness, improved formulations have been developed which include new adjuvants capable of improving the host immune response. Design vaccines not only allow the use of new forms of administration with better results, but also its formulation makes the cold chain unnecessary, which would facilitate their use in developing countries. Despite these advances, important challenges remain. One of the most evident is the development of vaccines against viruses with a high mutational rate, which increases the possibility of emerging species.

Palabras clave: *vacuna, ingeniería genética, adyuvantes, virus.*

1 INTRODUCCIÓN

PANORAMA HISTÓRICO DE LAS VACUNAS

Las vacunas han marcado un antes y un después en la historia de la medicina, debido al gran impacto que han tenido tanto en la salud como en la esperanza de vida de las personas. El desarrollo y la puesta en marcha de sistemas regulares de inmunización han demostrado ser una medida eficaz en el control de muchas enfermedades infecciosas, llegando incluso a erradicar la viruela a nivel mundial, sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de muerte en el mundo.

Las primeras vacunas se desarrollaron de forma empírica, ya que, se desconocía la naturaleza del antígeno causal y los efectos que suponía la inmunización en los individuos. Actualmente, gracias a los avances en biología molecular y desarrollo de la ingeniería genética es posible el diseño racional del antígeno vacunal y la creación de vacunas más eficaces y seguras. A continuación revisaremos brevemente los principales acontecimientos que se han producido en el desarrollo de vacunas desde sus orígenes hasta nuestros días, basándonos principalmente en la tecnología empleada para ello (1).

La historia de las vacunas comienza a finales del siglo XVIII con el descubrimiento del concepto de atenuación. En el siglo XIX se desarrollaron las primeras vacunas inactivadas, y fue a partir de finales del siglo XX cuando gracias a los avances en biología molecular, comenzó la era de la ingeniería genética (2).

Descubrimiento de la atenuación

El nacimiento de las vacunas se remonta al año 1798 cuando Edward Jenner, tras un tiempo haciendo observaciones, se percató que el virus de la viruela de la vaca que producía una enfermedad leve en humanos, podía ser utilizado para prevenir la viruela basándose en el principio de que un agente virulento para un animal podía ser atenuado en humanos. Desarrolló una técnica de profilaxis que consistía en la introducción del polvo de las costras producidas por el virus de la viruela sobre una incisión previamente hecha en la piel de la persona a la que se quería proteger de la enfermedad.

Sin embargo, la historia de las vacunas con una base científica comenzó en el laboratorio de Luis Pasteur al formular la hipótesis de que algunos patógenos podían ser atenuados si se les expone a ciertas condiciones ambientales tales como modificaciones nutricionales, altas temperaturas, oxígeno o productos químicos. Su consecutivo estudio con el *Bacillus anthracis* y el *virus de la rabia* confirmó su hipótesis (3).

No obstante, la técnica de atenuación más poderosa y eficaz consistía en el cultivo en serie de un patógeno *in vitro* o en un ambiente inusual. L.Calmette and C.Guérin hicieron 230 pases de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* bovino en un medio

artificial para obtener una cepa atenuada que protegiera contra la tuberculosis humana (4).

La revolución llegó cuando se descubrió que las células cultivadas *in vitro* podían utilizarse como sustrato para el crecimiento viral. El pase en cultivos celulares conduce a la adaptación del virus a crecer en ese medio, y los mutantes mejor capacitados para crecer son generalmente los que han perdido o modificado los genes que les permiten infectar y propagarse en el huésped humano. De esta manera, la vacuna de la polio oral de Sabin, la vacuna contra la varicela y la hoy conocida como triple vírica (sarampión, rubeola y paperas) fueron creadas gracias a la selección de clones con virulencia reducida, producto del pasaje en cultivos celulares *in vitro*. La adaptación del virus a crecer a temperaturas inferiores a 37 grados, es otra estrategia de atenuación que fue usada en el desarrollo de la vacuna contra la rubeola (3).

Otra tecnología importante aplicada a virus ARN con genomas segmentados fue el reordenamiento genómico en el cultivo celular. La idea se basaba en que dos virus ARN con genomas segmentados podían cultivarse simultáneamente, seleccionando posteriormente un clon, y de este modo aislar un nuevo virus con segmentos de RNA de ambos virus. Gracias a este método se desarrollaron las vacunas atenuadas contra *Influenza* y *rotavirus humano* (5).

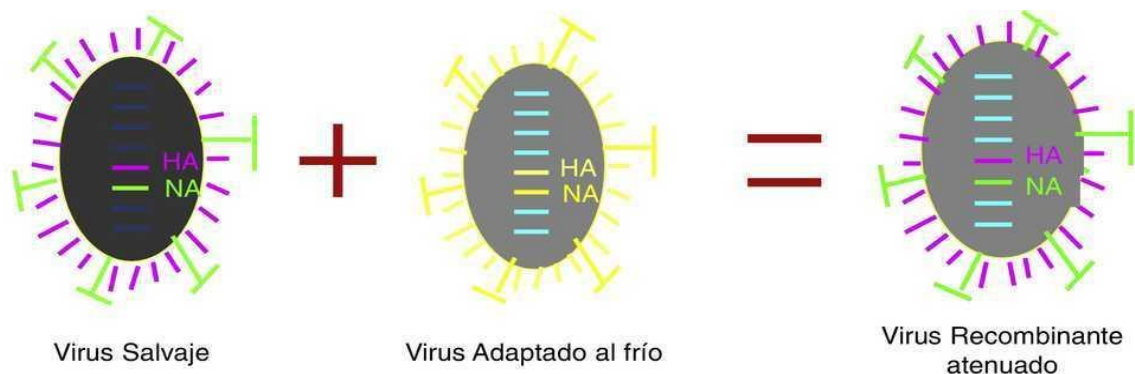


Figura 1: **Reordenamiento de genomas de ARN segmentado para la producción de vacunas contra Influenza atenuadas.** Cultivo simultáneo del virus salvaje, que contiene los antígenos HA y NA de alta virulencia, con un virus adaptado al frío que presenta genes de atenuación que le permiten crecer a 25° C y que además le restringen el crecimiento a temperaturas de 38° - 39 °C. El resultado es la producción de un virus recombinante atenuado sin capacidad patogénica, adaptado al crecimiento a temperaturas bajas sin posibilidad de multiplicación sistémica y que además es capaz de inducir una respuesta inmune protectora. (Modificado de: 6).

El principal problema que planteaban estas primeras vacunas atenuadas era la posibilidad de revertir hacia una forma más virulenta y causar la enfermedad en el hospedador. Fue a finales del siglo XIX cuando los investigadores descubrieron el concepto de inactivación, lo que permitió el desarrollo de vacunas más seguras y con menos efectos adversos. A continuación se exponen los distintos métodos utilizados para la creación de las primeras vacunas inactivadas.

Primeras vacunas inactivadas

❖ Microorganismo inviable

Los científicos observaron que tras someter cuidadosamente a una bacteria a un tratamiento químico o con calor, esta se volvía inviable pero seguía manteniendo su inmunogenicidad. Fueron D. Salmon y T. Smith quienes primero aplicaron el principio de inactivación, y lo hicieron sometiendo a patógenos como *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae* a un tratamiento con calor, creando de esta manera las primeras vacunas inactivadas de células enteras.

Por otro lado, la inactivación química se basaba en utilizar ciertas sustancias como el formaldehído con el propósito de inactivar patógenos. La primera vacuna desarrollada con esta técnica fue la vacuna contra la tos ferina de células enteras inactivadas (2). Cabe destacar que algunas enfermedades bacterianas son producidas por toxinas liberadas por las propias bacterias, como ocurre con las toxinas tetánica o diftérica. En 1923 los investigadores descubrieron que era posible inactivar químicamente la toxicidad de esas moléculas, a la vez que se mantenía la capacidad para inducir anticuerpos protectores, y en consecuencia se desarrollaron las primeras vacunas basadas en toxoides inactivados (7).

Más tarde en el siglo XX, la inactivación química fue utilizada en el desarrollo de vacunas contra virus. La vacuna inactivada contra el virus *Influenza* fue la primera vacuna inactivada contra virus que tuvo éxito, a la cual siguieron la vacuna contra la polio inactivada desarrollada por J.Salk y la vacuna contra la hepatitis A de virus enteros inactivados (2).

❖ Particuladas:

- Polisacáridos y conjugados

Durante la década de 1970 se desarrollaron las primeras vacunas particuladas. Este tipo de vacunas no utilizaban el microorganismo completo, sino un pequeño fragmento del mismo.

Las vacunas basadas en polisacáridos capsulares fueron las primeras en desarrollarse, y utilizaban los polisacáridos capsulares de algunas bacterias como inmunógeno, aprovechando su capacidad para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. En base a esto se desarrolló una vacuna que contenía polisacáridos de *Neisseria meningitidis* (8).

Posteriormente descubrieron que los polisacáridos del *Streptococcus pneumoniae* eran también inmunogénicos a pesar de existir diferencias químicas entre los distintos serotipos. Por este motivo se crearon vacunas basadas en múltiples combinaciones de polisacáridos del neumococo para prevenir las infecciones causadas por los diferentes serotipos (9). Este principio fue aplicado más tarde por Porter W. Anderson y David H. Smith para desarrollar la primera vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b basada en polisacáridos capsulares (10).

Posteriormente se observó que las vacunas basadas en polisacáridos capaces de generar anticuerpos séricos y prevenir la enfermedad en adultos, no eran inmunogénicas en niños. Los niños presentan una respuesta T independiente y son incapaces de crear una respuesta mediada por células B dirigida contra el polisacárido. El problema se solucionó uniendo al polisacárido una proteína transportadora que permitiese activar a los linfocitos T, aumentando así la inmunogenicidad y creándose de esta manera el concepto de vacuna conjugada (11). La primera vacuna conjugada comercializada fue contra *Haemophilus influenzae tipo b* en el año 1987 (12), y más recientemente en la década del 2000 se desarrollaron la vacuna conjugada contra el neumococo y meningococo (2).

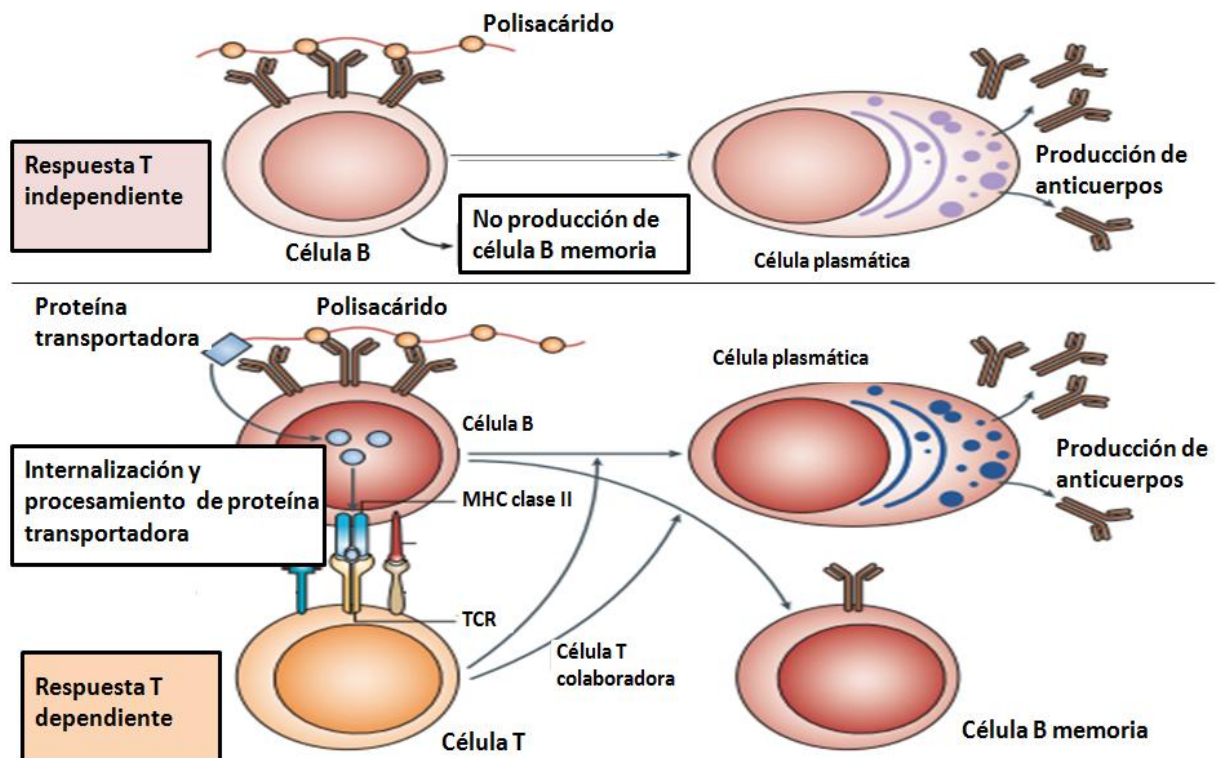


Figura 2: **Respuesta inmune vacuna polisacárida vs vacuna conjugada.** Las vacunas basadas en polisacáridos capsulares inducen únicamente la activación de células B, produciendo una respuesta inmune T- independiente. El acoplamiento de una proteína transportadora permite la activación de células T y además produce memoria inmune (Modificado de: 13).

- Basadas en proteínas purificadas ("vacunas subunidad")

Algunas vacunas se basan en la utilización de antígenos fragmentados o purificados procedentes del agente infeccioso, como puede ser una proteína purificada o un fragmento de membrana externa. Algunas de las vacunas inactivadas contra el virus *Influenza* utilizadas hoy en día son creadas mediante crecimiento viral en huevos embrionarios y después fraccionando el virus completo con detergentes. De esta manera se aísla y purifica la proteína viral hemaglutinina y se utiliza como antígeno en la vacuna.

Otro ejemplo de ello es la vacuna acelular de la tos ferina, la cual ha sustituido a la vacuna de células enteras en muchos países, al basarse únicamente en utilizar de una a cinco proteínas de *Bordetella pertussis* y actuar con la misma eficacia sin promover reacciones febriles (14).

La primera vacuna creada contra la Hepatitis B también utilizaba esta tecnología. Se basaba en la purificación de partículas del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B obtenidas del plasma de los pacientes infectados. Sin embargo, esta vacuna no era efectiva a largo plazo (15).

LOS AVANCES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

En la segunda mitad del siglo XX gracias a los avances en biología molecular se produjo la revolución de la ingeniería genética, también conocida como tecnología del ADN recombinante. Consiste en un tipo de manipulación genética que permite aislar y manipular el ADN para introducirlo en células u organismos pluricelulares (2).

Esto conllevó importantes avances en multitud de terrenos, entre ellos el desarrollo de vacunas, y su primer gran fruto fue la creación de la vacuna recombinante contra la Hepatitis B en 1986. Basándose en los avances en ingeniería genética, P. Varenzuela fue capaz de aislar el segmento de DNA que codificaba el antígeno de superficie y lo introdujo en células de levadura que produjeron grandes cantidades de partículas de antígeno de superficie *in vitro* (16).

Los recientes avances que se han producido en ingeniería genética y bio-informática han permitido el diseño racional de nuevos antígenos vacunales y el desarrollo de vacunas más seguras, eficaces y económicas. Ejemplo de ello son las vacunas basadas en proteínas y vectores recombinantes, partículas similares a virus o las vacunas de ADN o ARN, que han revolucionado el campo de la inmunización y de las que hablaremos más adelante (2).

2 INTERACCIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON LOS VIRUS

Desde el punto de vista funcional podemos clasificar el sistema inmune en innato y adquirido, aunque ambos funcionan de manera integrada, colaborando entre sí para dar lugar a una respuesta inmune eficaz. Por un lado el sistema inmune innato activa el sistema inmune adaptativo, y este, a su vez, utiliza los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar microorganismos (17).

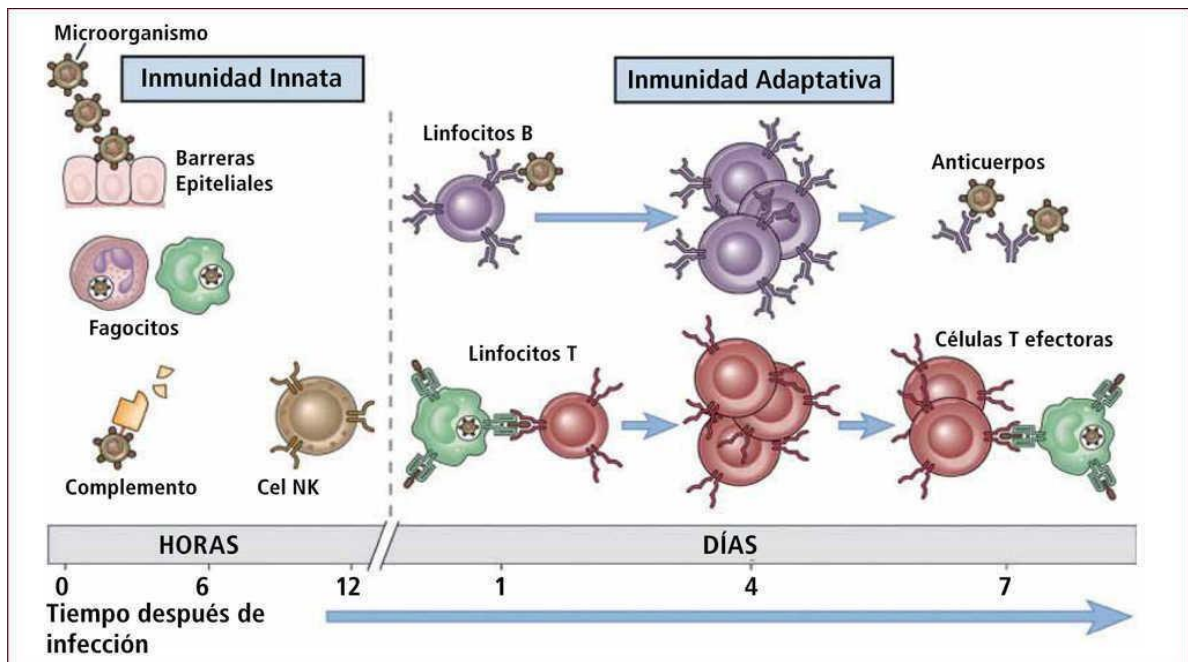


Figura 3: **Sistema inmune innato y adaptativo.** Una de las principales funciones del sistema inmune es la defensa contra microorganismos. La inmunidad innata es la primera en actuar, seguida de la inmunidad adaptativa que producirá una respuesta más específica y efectiva frente a exposiciones repetidas (17).

2.1 SISTEMA INMUNE INNATO

El sistema inmune innato es considerado la primera línea de defensa contra patógenos invasores, ya que posee mecanismos pre-existentes capaces de activarse rápidamente, precediendo a la inmunidad adaptativa. Sus principales componentes son:

- Barreras físicas y químicas
- Células fagocíticas
- Células Natural Killer (NK)
- Sistema del complemento
- Citocinas pro-inflamatorias
- Receptores tipo Toll (RTT)

La inmunidad innata tiene una especificidad limitada, ya que se dirige contra estructuras comunes a distintos grupos de microorganismo en lugar de reconocer determinantes antigénicos propios de un microorganismo determinado. El reconocimiento es posible gracias a los denominados receptores de reconocimiento de patrón (PRR), unas proteínas que son el elemento clave del sistema inmune innato y están expresadas fundamentalmente en las células presentadoras de antígeno, como

son las células dendríticas o los macrófagos. Existen distintos tipos de PRR, destacando especialmente los receptores tipo Toll (RTT), que son unos receptores transmembrana que reconocen estructuras altamente conservadas de los patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (17).

Una vez producida la unión entre los RTT y los PAMPs, las células dendríticas absorben eficazmente el material viral y procesan las proteínas virales presentándolas en forma de péptidos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II. La interacción entre el MHC y los receptores de células T (TCR) se ve favorecida por señales coestimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias producidas por la inmunidad innata, permitiendo así la posterior activación de las células T CD8 y CD4 (18, 19).

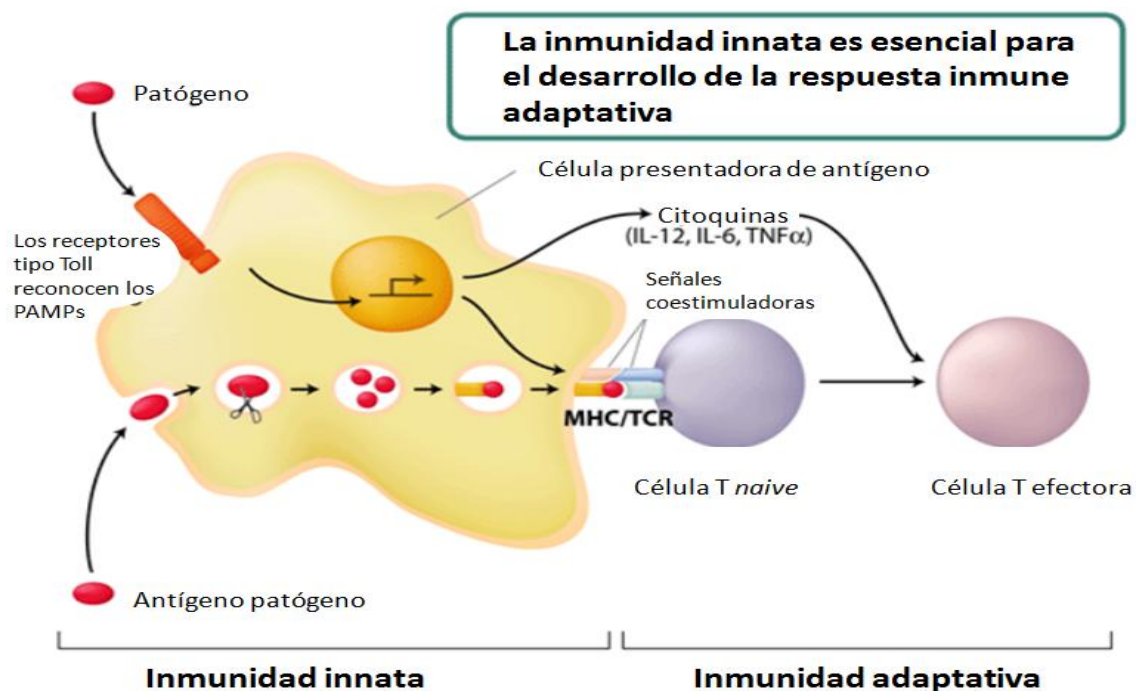


Figura 4: **Interacción entre sistema inmune innato y adaptativo.** Los receptores tipo Toll presentes en las células presentadoras de antígenos reconocen los patrones moleculares de agentes microbianos. Esto induce la liberación de citoquinas y señales coestimuladoras que favorecen la presentación del antígeno a las células T y su posterior activación. (Kobayashi, K. S. et al. What is innate immunity? Dana-Farber Cancer Institute. Harvard Medical School)

Los receptores tipo Toll han sido ampliamente estudiados por el importante papel que juegan en el desarrollo de vacunas. Los adyuvantes, moléculas utilizadas para aumentar la inmunogenicidad de algunas vacunas, actúan a través de estos receptores para activar el sistema inmune innato y permitir de esta manera el posterior y correcto desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular (17).

2.2 SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

Las vacunas inducen una respuesta inmune adaptativa que está definida por las propiedades de especificidad y memoria. Este sistema adaptativo posee dos tipos de respuestas:

- ❖ Respuesta inmune humoral: mediado por linfocitos B productores de anticuerpos neutralizantes cuya principal función consiste en prevenir y determinar la frecuencia de la infección.
- ❖ Respuesta inmune celular: mediado por linfocitos T los cuales se encargan del reconocimiento y aclaramiento de las células infectadas por virus, determinando en muchas ocasiones la severidad de la enfermedad

Anticuerpos neutralizantes

La mayoría de las vacunas antivirales trabajan induciendo anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de superficie de los virus con envoltura o contra determinadas proteínas en virus sin envoltura. Los anticuerpos son el elemento principal de la respuesta inmune adaptativa que ha de alcanzar niveles protectores para estar presente durante la re-exposición al agente patógeno. Son los únicos elementos de la respuesta adaptativa capaces de reconocer a un virus antes de que infecte a la célula. Los anticuerpos existentes pueden actuar con la misma velocidad que la respuesta inmune innata, pero con mayor avidez y especificidad. Por lo tanto, un importante objetivo inmunológico es la inducción de una respuesta mediada por anticuerpos que sea duradera.

La respuesta de anticuerpos protectores se considera óptima cuando neutralizan e inhiben la infección. La neutralización puede ocurrir por tres mecanismos. En primer lugar, el anticuerpo bloquea directamente la unión del virus a la célula diana obstruyendo el dominio de unión al receptor. Un segundo mecanismo muestra como la neutralización puede producirse tras el acoplamiento viral, al evitar la entrada en la célula o el desprendimiento a través la inhibición de la fusión. Por último, la agregación o inmovilización de los virus reduce el inoculo infeccioso al evitar que el virus alcance la célula diana (20).

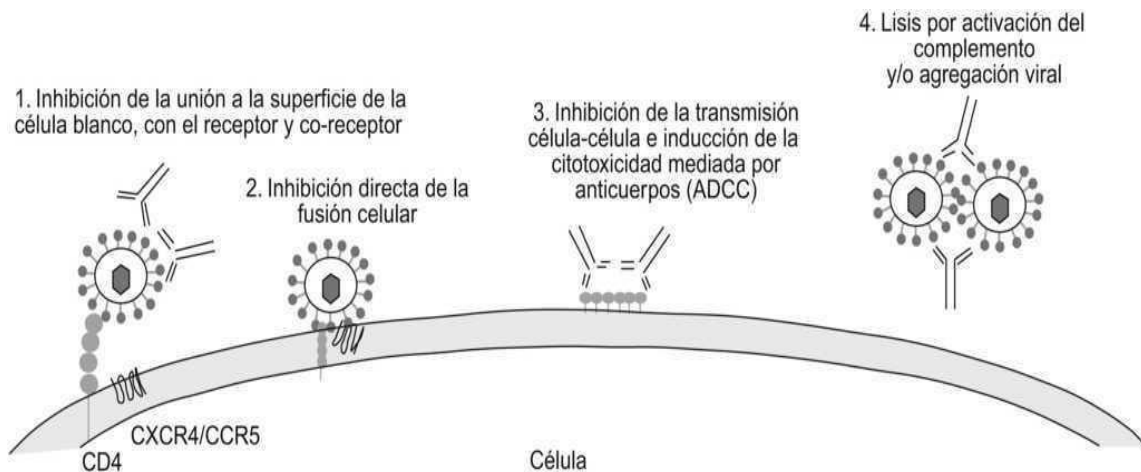


Figura 5: **Mecanismos de neutralización mediados por anticuerpos.** 1) Los anticuerpos se unen a las proteínas de envoltura vírica y ocupan los sitios de unión al receptor inhibiendo de esta manera la interacción del virus con la célula huésped. 2-3) Tras la unión a los receptores, los anticuerpos son capaces de inhibir la fusión de las membranas e impedir de esta forma la entrada del virus a la célula. Además son capaces de inhibir la transmisión o el desprendimiento de una célula a otra. 4) Finalmente la agregación viral o la virolisis por activación del complemento también contribuyen al efecto neutralizador de los anticuerpos al impedir que el virus alcance la célula (21).

Células T CD8 citolíticas

A pesar de que los anticuerpos son reconocidos como el mecanismo principal de la respuesta inmune protectora inducida por las vacunas, es raro que la deficiencia de anticuerpos se asocie con la severidad de una enfermedad viral. La excepción a esto es la infección por picornavirus que puede ser letal en el contexto de un déficit de inmunoglobulinas. La severidad de la enfermedad en la mayoría de las infecciones virales es mayor y en ocasiones letal cuando existen deficiencias en las células T (20).

Las células T CD8 efectoras o citolíticas, que son un elemento clave en el aclaramiento de las células infectadas, son activadas por la unión de los TCR y el MHC de clase I. Cabe destacar que algunos virus, como el virus del *Herpes*, disminuyen la expresión de moléculas del MHC de clase I, dificultando de esta manera la presentación del antígeno e impidiendo el reconocimiento y la activación de las células T CD8. En contraposición, las células NK del sistema inmune innato son capaces de reconocer y eliminar las células con expresión reducida del MHC de clase I. Asimismo, la actividad mediada por las células NK se ve favorecida por los anticuerpos producidos por las células B, lo que supone un ejemplo más de la interacción existente entre la inmunidad innata y adquirida.

Por otro lado, las células T CD4 colaboradoras ayudan a las células B en la producción de anticuerpos neutralizantes. Además, también son un elemento clave de ayuda para las células T CD8 al producir gran cantidad de citoquinas proinflamatorias, llegando incluso a tener un papel importante en la citotoxicidad mediada por células (18).

Por estos motivos, las respuestas específicas de las células T son importantes para controlar la infección viral y limitar su severidad. Sin embargo, hasta la fecha ninguna vacuna ha sido autorizada en Estados Unidos basada únicamente en la inducción de una respuesta inmune mediada por células T (20).

3 ESTRATEGIAS EN EL DISEÑO DE VACUNAS DIRIGIDAS CONTRA VIRUS

Desde la invención de la primera vacuna en 1796 hasta la década de 1980, tanto el modo de preparación como la composición y eficacia de las vacunas, difiere mucho de lo que podemos lograr hoy en día gracias a los avances en ingeniería genética, que nos permite utilizar el material genético como antígeno vacunal. La ingeniería genética ha revolucionado diversos campos como son la Biología, la Biotecnología y por supuesto la Biomedicina, marcado un antes y un después en las estrategias utilizadas para el desarrollo de vacunas. Vamos a hacer una revisión general de las distintas técnicas, tanto clásicas como moleculares, de las que se dispone para el desarrollo de vacunas.

En primer lugar vamos a clasificar las vacunas en función de la naturaleza del antígeno empleado.

1. Vacunas vivas atenuadas
2. Vacunas inactivas con microorganismo entero o fragmento del mismo.
3. Vacunas genéticas basadas en ADN y ARN. Ingeniería genética.

3.1 VACUNAS VIVAS ATENUADAS

Una vacuna viva consiste en un microorganismo capaz de infectar células y replicarse por sí mismo pero sin causar la enfermedad, ya que esta capacidad, ha sido eliminada virtualmente en un proceso denominado atenuación. El propio microorganismo actúa como inmunógeno complejo, induciendo generalmente tanto inmunidad humoral como celular.

La atenuación tiene como objetivo lograr el difícil equilibrio entre la eliminación de la patogenicidad del microorganismo y la capacidad para seguir induciendo una respuesta inmune eficaz. Además es importante mantener esta atenuación en el tiempo, es decir, lograr la estabilidad o la irreversibilidad de la atenuación, ya que los microorganismos que mantienen la capacidad de replicación pueden volverse virulentos en algunos casos (7). Por tanto la principal dificultad que plantea el desarrollo de este tipo de vacunas es decidir qué tipo de mecanismo de atenuación emplear. A continuación se exponen los más relevantes.

MÉTODOS DE ATENUACIÓN

Existen seis métodos de atenuación clásicos para los distintos agentes virales:

❖ Pases seriados en cultivos celulares

Las células cultivadas in vitro son empleadas como sustrato para el crecimiento viral, y el pase seriado en estos cultivos facilita la producción de mutaciones durante la replicación viral. Dichas mutaciones pueden suponer la pérdida o modificación de genes implicados en la capacidad para infectar y expandirse en el organismo, por lo que posteriormente se seleccionan las cepas menos virulentas (22).

Algunas de las vacunas desarrolladas en base a esta técnica son la vacuna de la triple vírica (sarampión, rubeola y paperas), la varicela y la polio (23,24).

❖ Utilización de virus homólogo causante de enfermedad en animales

Esta técnica se basa en el principio de que un virus animal está naturalmente atenuado para el ser humano, sin embargo, al estar inmunológicamente relacionado es capaz de inducir una respuesta inmune eficaz. La primera vacuna desarrollada de la historia se basaba en esta técnica, y utilizaba el virus *vaccinia* de origen bovino para proteger contra la viruela humana (25).

❖ Cultivo simultáneo de dos virus

El cultivo de dos virus diferentes en un mismo cultivo celular deriva en la obtención de un nuevo virus con el genoma reordenado que contiene segmentos de ambos virus parentales.

Ejemplo de ello es el cultivo simultáneo de rotavirus animal y humano, donde se obtiene un virus que mantiene la mayor parte del genoma del virus animal y además un gen de rotavirus humano que codifica para una proteína de superficie responsable de la generación de anticuerpos neutralizantes específicos para rotavirus humano (26). Esta técnica también ha sido utilizada para desarrollar una vacuna contra el virus *Influenza* (27).

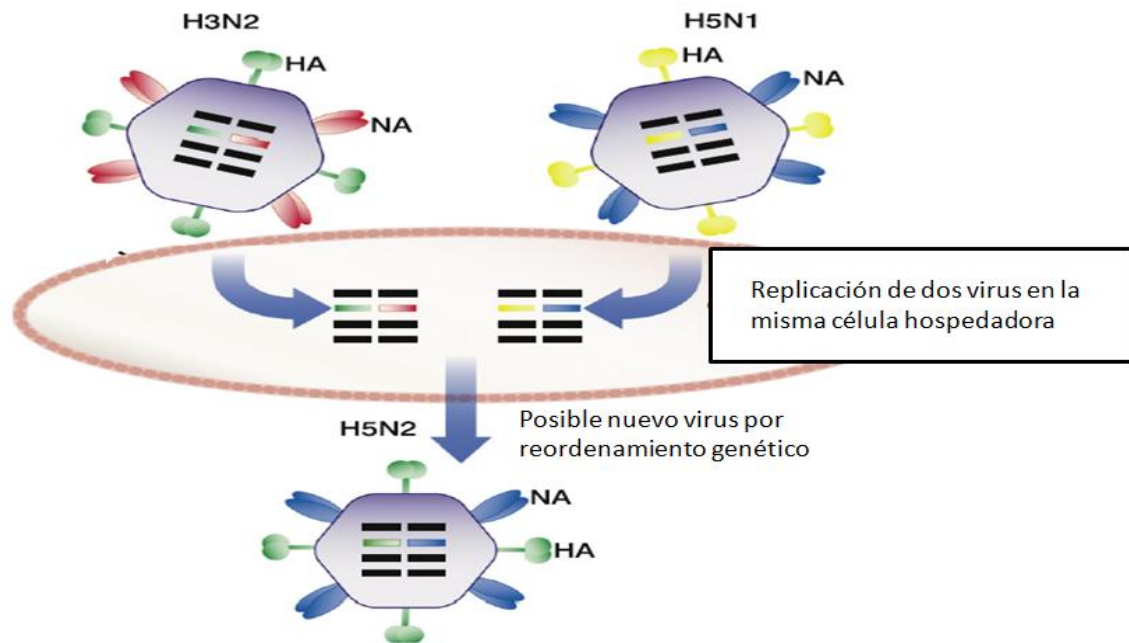


Figura 6: **Reordenamiento genético de dos cepas de virus Influenza en el cultivo celular.** Cuando dos o más cepas de virus Influenza con genomas RNA segmentados infectan la misma célula, los segmentos genéticos de ambos pueden reordenarse para dar lugar a una nueva cepa viral que presenta antígenos de superficie diferentes a los virus originales. Este hecho da lugar a lo que denominados como “cambio antigénico” e implica la posibilidad de que la nueva cepa resultante produzca una infección pandémica al no disponer de anticuerpos neutralizantes específicos contra esta nueva variedad del virus (Modificado de: 28).

❖ Mutantes adaptados al frío o incapaces de crecer a temperaturas superiores a 37° C

Los mutantes virales que han sido adaptados a crecer a bajas temperaturas tendrán menor capacidad para multiplicarse en el organismo humano y por tanto se consideran atenuados. Las vacunas contra *Influenza* y *virus respiratorio sincitial* son desarrolladas en base a esta adaptación (29).

❖ Introducción de mutaciones reductoras de virulencia.

La manipulación del material genético permite introducir ciertas mutaciones, generalmente en forma de inserción de un elemento genético móvil o delección. Esto conlleva la inactivación de genes involucrados en procesos metabólicos o de factores de virulencia. De este modo obtenemos una cepa atenuada con una probabilidad de reversión virulenta nula o muy baja (7).

❖ Vectores recombinantes transportadores de genes de diferentes patógenos

Algunos virus y bacterias han sido estudiados por la posibilidad de que actúen como vectores transgénicos para los antígenos de otros agentes patógenos en la preparación de vacunas, surgiendo así el término de “vacuna vectorificada” (2).

Las técnicas con ADN recombinante nos permiten identificar una secuencia de ADN de interés, y amplificar dicha secuencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente se clona dicha secuencia en el sistema celular adecuado y se expresan y purifican las proteínas de interés. El vector de expresión es en este caso un microorganismo recombinante que expresa la proteína derivada de otro microorganismo, que en este caso actuará como inmunógeno (28).

El primer vector de expresión con licencia fue una cepa atenuada de fiebre amarilla que sirvió como vector para los genes de la proteína M y E del virus de la encefalitis japonesa (2). Recientemente el virus vaccinia ha sido estudiado y empleado como vector de expresión de la proteína de superficie gp120 del VIH 1 (7).

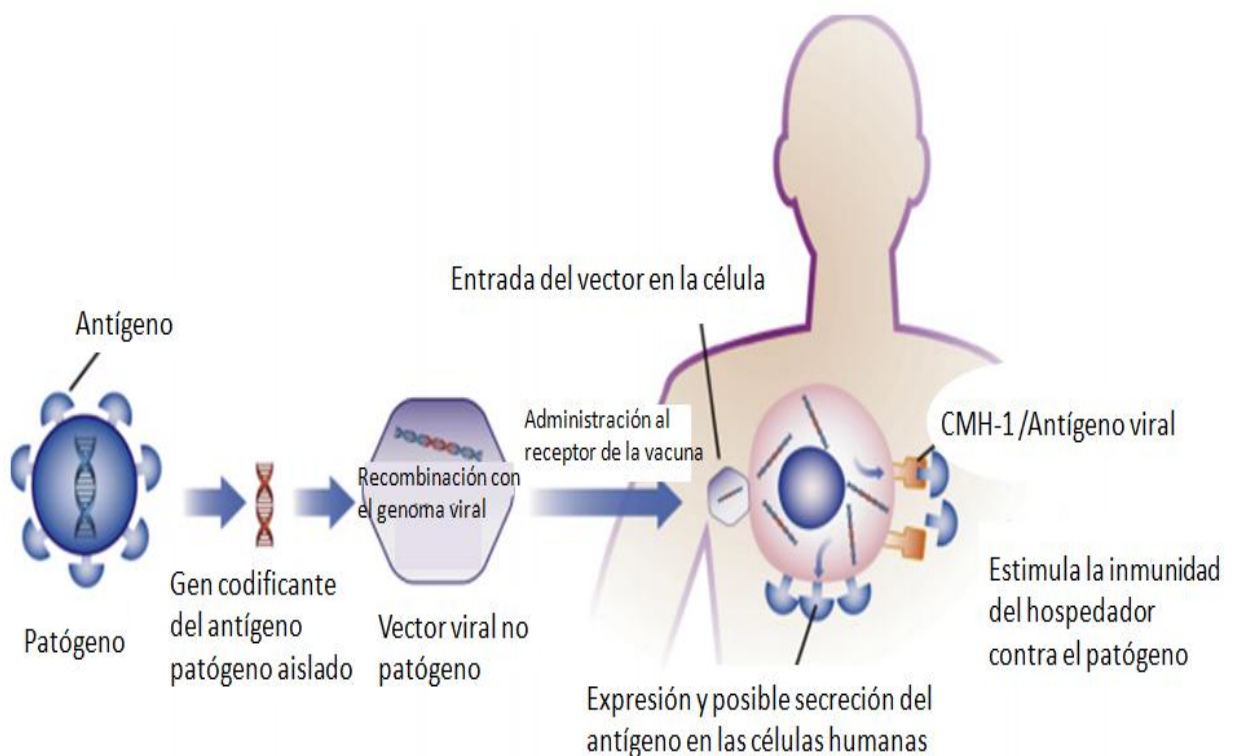


Figura 7: **Vacunas basadas en vectores virales recombinantes.** Los genes que codifican los antígenos patógenos son aislados e introducidos en el genoma de vectores virales no patógenos. De este modo se aprovecha la capacidad del virus para infectar e introducirse en la célula huésped y las proteínas antigénicas de interés son expresadas. El vector viral es capaz de fabricar grandes cantidades de antígeno in vivo, para que este sea posteriormente expresado en la superficie de las células infectadas (Modificado de: 28).

3.2 VACUNAS INACTIVADAS

Las vacunas inactivadas o vacunas no vivas pueden consistir en un microorganismo entero previamente inactivado e incapaz de multiplicarse en las células y por tanto de revertir su patogenicidad, o de componentes celulares purificados derivados de este o bien obtenidos utilizando las técnicas de ADN recombinante (7).

3.2.1 MICROORGANISMOS INACTIVADOS

La inactivación del microorganismo entero se puede realizar químicamente o con calor, con el objetivo de generar una repuesta inmune humoral con producción de anticuerpos que logren neutralizar al patógeno.

Los virus son primeramente cultivados en células y recolectados de los sobrenadantes, y posteriormente se purifican mediante técnicas de precipitación y cromatografía (30). Las partículas virales resultantes son inactivadas químicamente con fenol o tiomersal, y además se les añade un adyuvante con el fin de potenciar de manera no específica, mediante activación del sistema inmune innato, la respuesta inmunitaria frente al patógeno (7).

3.2.2 COMPONENTES PURIFICADOS: PROTEINAS, PÉPTIDOS Y POLISACÁRIDOS

Las vacunas basadas en componentes purificados se obtienen identificando epítomos protectores y sus correspondientes proteínas, para posteriormente purificarlas e inactivarlas con el fin de que sean utilizadas como antígeno.

La primera vacuna desarrollada contra el virus de la hepatitis B obtenía el antígeno de superficie purificado proveniente del plasma de los pacientes portadores, posteriormente era sometido a una inactivación química con el fin de inactivar cualquier virus presente. Igualmente algunas toxinas bacterianas como la tetánica, diftérica o pertussis pueden ser aisladas y purificadas, para posteriormente inactivarlas con un tratamiento químico con formalina o glutaraldehído, y así producir los toxoides correspondientes (7). Otra posibilidad es la inactivación genética mediante la introducción de mutaciones en los genes codificantes para estas toxinas, de tal forma que generen un producto atóxico que mantiene su estructura antigénica (31).

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante y los avances en bioinformática permiten identificar secuencias de genomas microbianos e incluso deducir ciertas secuencias de aminoácidos que codifiquen para proteínas de membrana externa o que tengan algún efecto tóxico en las células. Una vez identificados los genes podemos expresarlos en un microorganismo, bacteria (generalmente *Escherichia coli*), levadura o virus, para posteriormente purificar las proteínas por ellos codificadas, o tomar ciertos péptidos inmunogénicos y sintetizarlos *in vitro*.

La vacuna recombinante contra el virus de la hepatitis B fue la primera en emplear esta técnica. En primer lugar se aísla el gen que codifica para el antígeno de superficie del virus, con capacidad para inducir una respuesta inmune, para posteriormente

introducirlo por técnicas de ingeniería genética en una levadura que lo produce a gran escala (7, 32). La vacuna contra el virus de la gripe utiliza una estrategia similar.

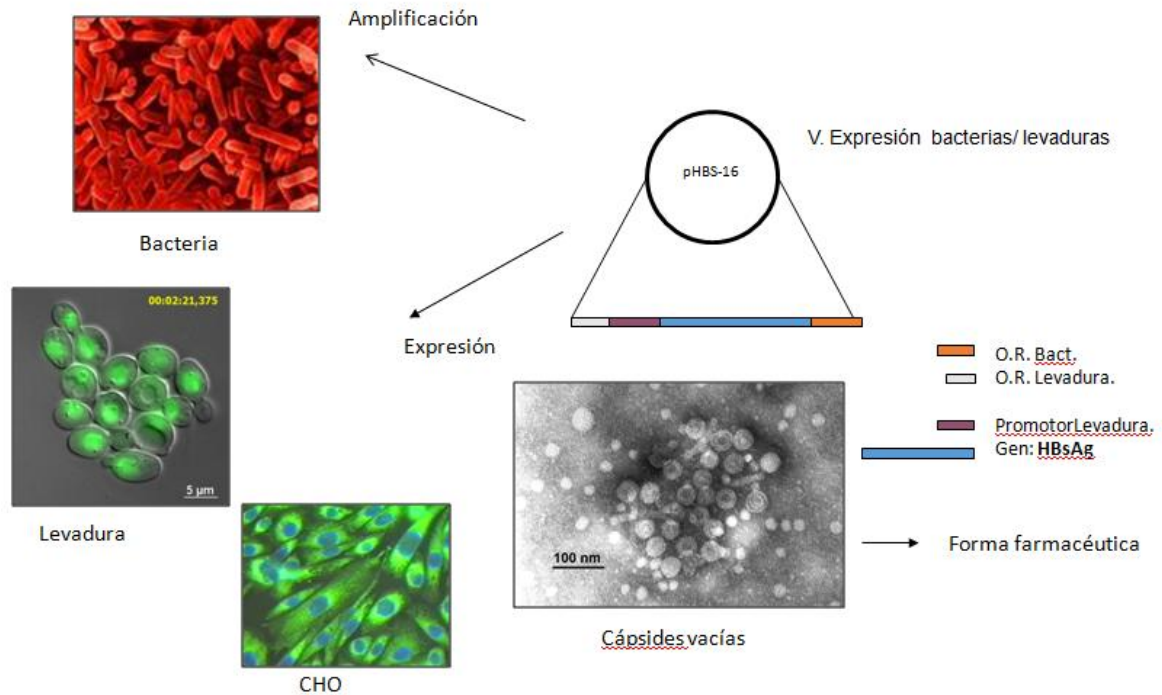


Figura 8: **Preparación de vacuna recombinante frente al virus de la hepatitis B.** El determinante genético del antígeno mayoritario de superficie del virus de H.B. se clona en un plásmido con capacidad de replicarse y expresar la proteína en diferentes hospedadores, eligiendo por métodos experimentales aquel que se considere más adecuado. El antígeno producido se purifica y se utiliza como tal o insertado en una bicapa lipídica como vacuna. (Imagen: elaborada por M.González-Carreró).

Actualmente se utiliza un tipo de estrategia que permite organizar los antígenos en estructuras inertes que asemejan a los virus (vacunas de la gripe, hepatitis B, etc.) logrando con ello una respuesta eficaz. Estas estructuras se denominan “virosomas”.

Algunas vacunas de virosomas autorizadas contra el virus de la gripe contienen vesículas lipídicas esféricas que incluyen las glicoproteínas virales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus *Influenza*. Se ha sugerido que la glicoproteína HA dirige los virosomas hacia las células presentadoras de antígenos que lo envuelven por endocitosis, y tras la degradación proteolítica presentan los antígenos a las células T facilitando su activación (45).

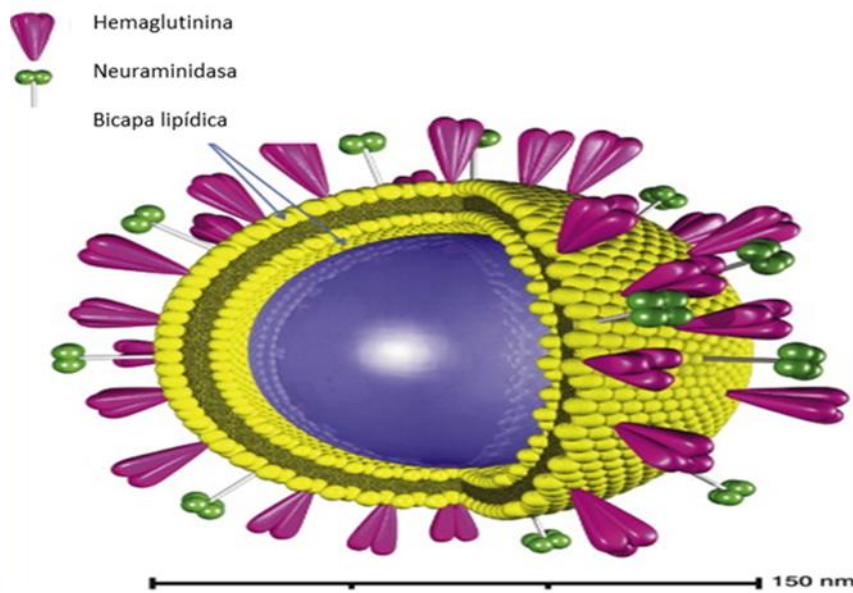


Figura 9: **Estructura de un virosoma.** Los virosomas utilizan las estructuras que componen los liposomas como base para encapsular y transportar proteínas virales, como son por ejemplo la HA y NA del virus Influenza. Estas proteínas dirigen el virosoma hacia las células de la inmunidad innata y permiten la liberación del antígeno vacunal (Modificado de: 45).

3.3 VACUNAS “GENÉTICAS” (BASADAS EN ADN Y ARN)

3.3.1 VACUNAS DE ADN

Las vacunas basadas en ADN, también conocidas como vacunas de tercera generación o vacunas genéticas, surgieron como consecuencia de los grandes avances logrados en áreas como la genómica y la proteómica, y han supuesto una nueva era para la inmunología. Se basan en el empleo de plásmidos o vectores de ADN que contienen los genes que codifican las proteínas de interés que serán empleadas como antígenos en la vacuna (1).

Las vacunas hasta ahora autorizadas están compuestas predominantemente de virus vivos atenuados, patógenos muertos o subunidades de patógenos. Las vacunas inactivadas confieren protección mediante respuestas humores y activación de células T CD41, y generalmente no proporcionan inmunidad de por vida. Por otro lado, las vacunas vivas atenuadas son capaces de inducir respuesta inmune tanto humoral como celular, generando inmunidad de larga duración. No obstante, este tipo de vacunas podría tener muchas limitaciones para su desarrollo si el objetivo es inducir inmunidad frente a multitud de subtipos virales y además existen preocupaciones en torno a su seguridad (33).

El desarrollo de vacunas de ADN supone una alternativa prometedora al presentar numerosas ventajas respecto a las vacunas previamente desarrolladas, especialmente en los siguientes aspectos :

- Seguridad: no emplean microorganismos vivos.
- Inducción de inmunidad: tanto de tipo humoral como celular.
- Versatilidad: derivada de la relativa facilidad para modificar los antígenos codificados en los plásmidos.
- Costo-efectividad: especialmente cuando se producen a gran escala y un breve espacio de tiempo.
- Estabilidad y mayor vida media: útil para el almacenamiento y transporte ya que se puede prescindir de la cadena de frío necesaria en las vacunas convencionales.

Diseño del antígeno y formulación de la vacuna “genética”

Como ya se ha mencionado antes , la unidad funcional de estas vacunas son plásmidos de ADN que contienen los genes codificantes de proteínas antigénicas, y que son utilizados como vectores en la vacunación con ADN. Los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN circular con capacidad para replicarse de forma independiente del cromosoma bacteriano e inducir la expresión de diferentes proteínas (1).

Numerosas investigaciones llevadas a cabo recientemente se han centrado en el diseño de un antígeno que permita hacer frente a patógenos altamente variables. Para diseñar el antígeno las secuencias de inmunógenos son seleccionadas de una colección de secuencias proteicas del antígeno diana. Los inmunógenos de consenso son diseñados para codificar el aminoácido que se encuentra con mayor frecuencia en cada posición de un fragmento de ADN, mientras los antígenos mosaico codifican las regiones más inmunogénicas de un antígeno. De un modo similar, las secuencias denominadas *inmunógenos del centro del árbol*, derivan de una secuencia nativa que representa el centro de la diversidad evolutiva, mientras que los inmunógenos ancestrales derivan de secuencias de antígenos que están en la raíz u origen del árbol filogenético. Estas técnicas de diseño tienen como objetivo elaborar una secuencia sintética que sea representativa de la diversidad de patógenos existentes , para que la respuesta inmune del hospedador responda mas eficazmente contra patógenos divergentes, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (33).

Se han documentado algunas estrategias en la formulación de vacunas de ADN que aumentan la inmunogenicidad del antígeno. La formulación de la vacuna en micropartículas o liposomas aumenta la transfección de las células presentadoras de antígenos y por tanto, induce respuestas inmunes humorales y celulares más robustas. Otro método consiste en la inclusión de plásmidos adicionales que codifiquen para interleucinas o moléculas coestimuladoras, que actuarán como adyuvantes moleculares capaces de modular la respuesta inmune adaptativa. Un

estudio ha demostrado que la utilización del factor estimulantes de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) como adyuvante molecular , induce respuestas humorales y celulares más potentes (33).

Vías de administración

Una vez diseñado el plásmido, debemos elegir la ruta y forma de inoculación adecuada para que este pueda inducir una respuesta inmune eficaz, ya que tan sólo del 1 al 10% del ADN inoculado se procesará de manera correcta para codificar la proteína de interés (34).

La piel, el músculo esquelético y las mucosas son las rutas de inoculación más utilizadas. En cuanto a la forma de inocular el ADN tenemos dos alternativas, la inyección directa de ADN y “la pistola genética”. La primera es la forma más utilizada ya que no requiere técnica ni preparación especial para su proceder , además de ser bastante económica, sin embargo el uso de la pistola genética supone ciertas ventajas (35). La inoculación de ADN mediante “pistola genética” se lleva a cabo acoplando la molécula de ADN a esferas de oro o tungsteno, y con ayuda de helio comprimido son disparadas en la dermis y capas subdérmicas haciendo que se produzca la transfección directa de las células presentadoras de antígenos. Esto permite reducir la cantidad de ADN necesario y aumentar la eficiencia de la inoculación. (1, 34, 35)

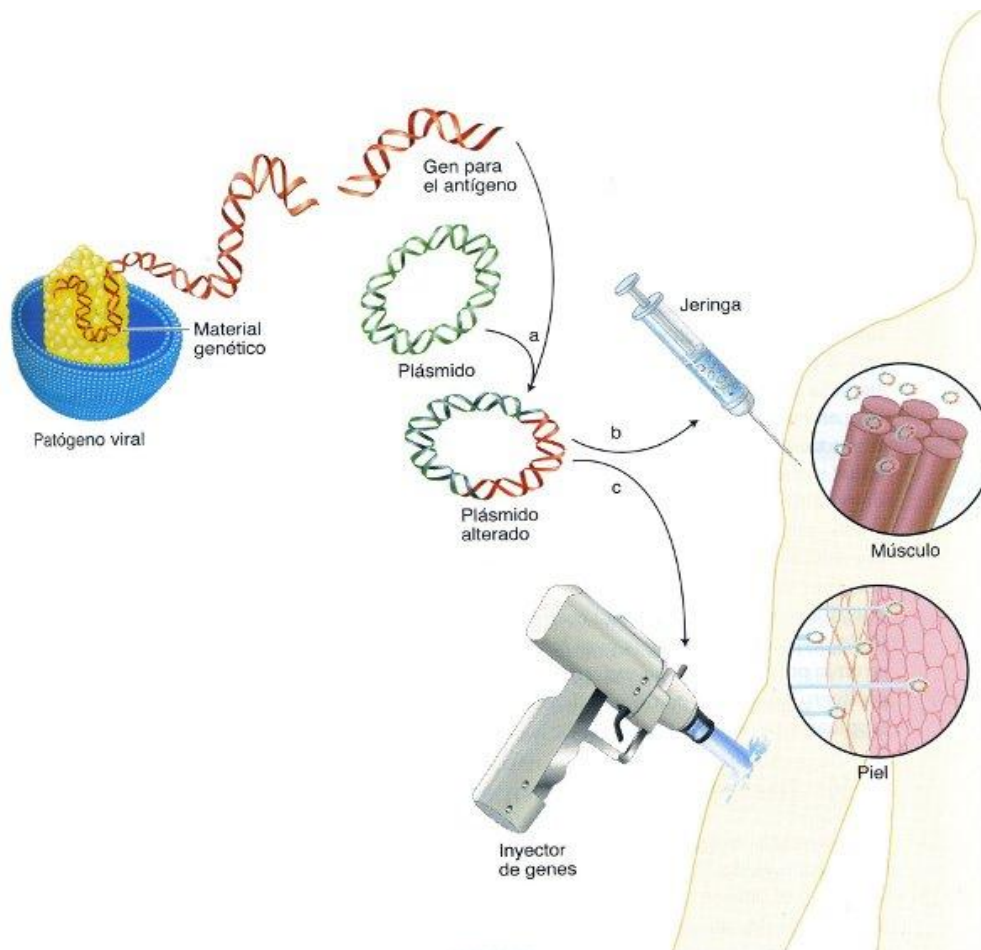


Figura 10: **Vías de administración de vacunas basadas en ADN: inyección con jeringa vs “inyector de genes”.** La inyección con jeringa supone un método clásico de administración que aplica el plásmido a las células musculares. Por otro lado, la pistola genética inyecta el ADN directamente sobre la piel, aumentando la transfección de las células presentadoras de antígenos (36).

Los parches dérmicos y la electroporación, que consiste en aplicar pulsos eléctricos cortos sobre el tejido, constituyen otros métodos no invasivos de aplicación de la vacuna que además aumentan la eficiencia de la transfección (33).

Mecanismos de respuesta inmune en vacunas genéticas

La célula es transfectada por el plásmido que se transloca al núcleo, donde se pone en marcha la transcripción del transgen. Después, los transcritos de ARN mensajero van al citoplasma donde se traducen en proteínas que son degradadas en el proteosoma en pequeños péptidos. Estos péptidos se transportan al retículo endoplásmico mediante un sistema de proteínas transportadoras, y una vez allí se vinculan con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I). El complejo péptido-MHC-I se trasladan a la superficie celular donde se une con el receptor de células T (TcR) presente en la superficie de los linfocitos T citotóxicos (CD8) permitiendo la activación de estos (1).

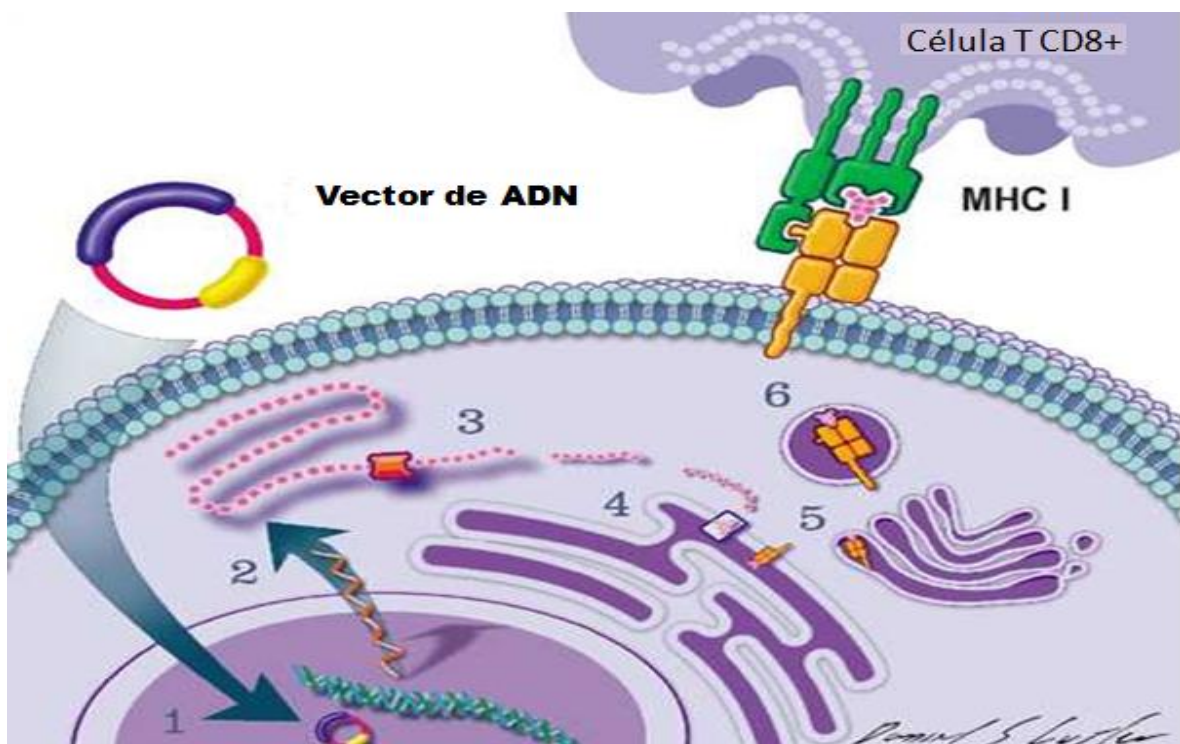


Figura 11: **Procesamiento y presentación del antígeno a las células T CD8 citotóxicas.** En primer lugar el plásmido de ADN que contiene el gen de interés se transloca al núcleo donde tiene lugar la transcripción. Posteriormente, los transcritos producidos van al citoplasma donde se traducen en proteínas que son degradadas en péptidos de

8 a 10 aminoácidos. Los péptidos son trasladados al retículo endoplásmico donde se vinculan con moléculas del MCH-I para exponerse en la superficie celular y unirse a los receptores de las células T CD8 o citotóxicas. (Modificado de: McDonell W.M, Askari F.K. The emerging role of DNA vaccines. Medscape).

Por otro lado, las proteínas exógenas fagocitadas por la célula presentadora de antígenos entran a la vía endosómica donde son degradadas en pequeños péptidos que se vinculan con moléculas del MCH-II. El complejo péptido- MCH-II se transloca a la superficie celular para unirse a los receptores de las células T CD4 o células colaboradoras. La posterior inducción de moléculas coestimuladoras por parte de la célula presentadora de antígenos completa la activación de los linfocitos T CD4 y CD8 ,generando una buena respuesta inmune de tipo celular (33).

Los antígenos que han sido secretados o presentados en la superficie celular también activan los receptores de las células B (BcR). Los linfocitos B activados se diferencian posteriormente en células plasmáticas o células memoria, estableciéndose así una fuerte respuesta de tipo humoral (35,36).

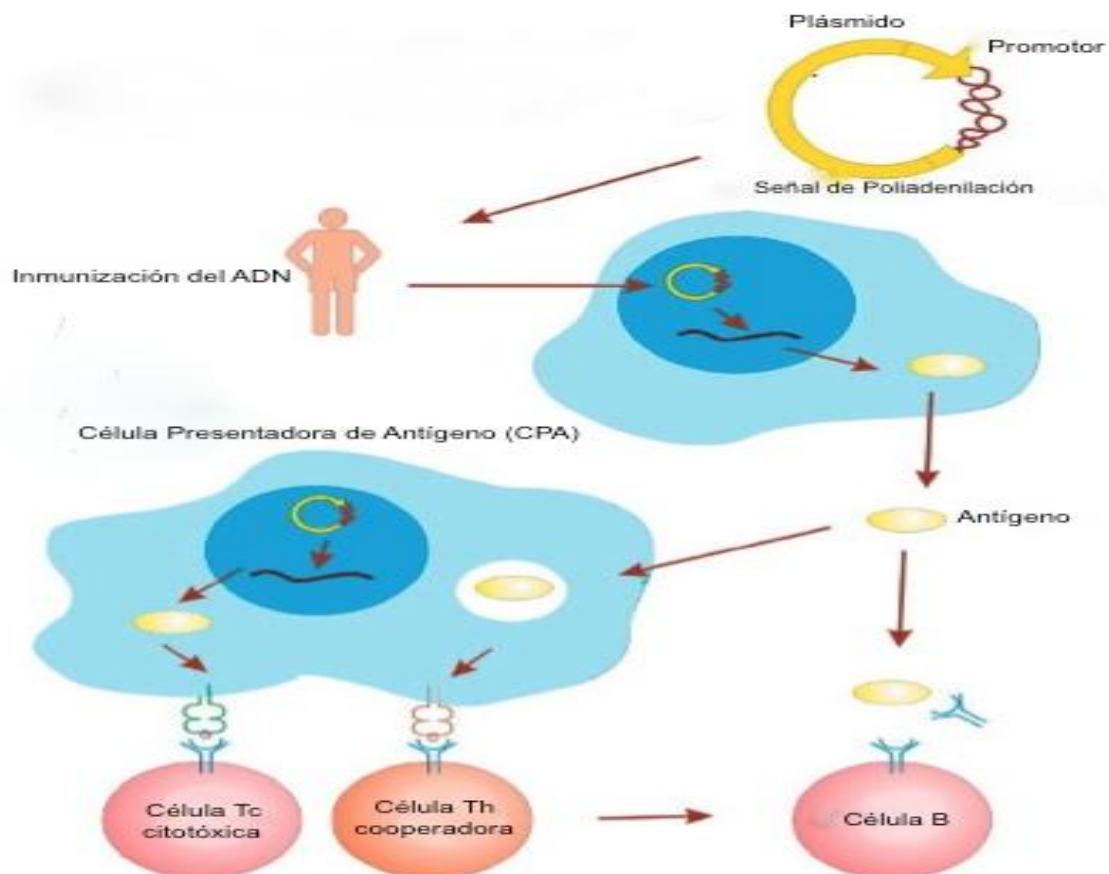


Figura 12: **Mecanismos generales de respuesta inmune inducidos por las vacunas genéticas.** El plásmido de ADN es inoculado e incorporado en la célula huésped donde se replica y traduce, dando lugar al antígeno de interés. Este antígeno es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes por parte de las células B, o en su defecto, puede ser capturado por la célula presentadora de antígenos donde es

procesado y presentado a la célula T (citotóxica o cooperadora) encargada de llevar a cabo la respuesta inmune celular. (Hurtado, M.M.Vacunas ADN. E-ciencia).

El desarrollo y la utilización de vacunas basadas en ADN no solo tiene como objetivo clínico prevenir infecciones virales y no virales , si no que además constituye una estrategia prometedora contra algunos tipos de cáncer.

La mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han evaluado la eficacia de vacunas de ADN dirigidas contra el VIH y otras infecciones virales, como son la hepatitis B y C , VPH y virus Influenza (34).

3.3.2 VACUNAS DE ARN

Las vacunas de ARN están compuestas por una molécula de ARN mensajero (ARNm) que codifica una proteína que será utilizada como antígeno en la vacuna. Esta vacunas aparecieron a mediados de la década de 1990, sin embargo, su desarrollo se vió afectado por problemas relacionados con la estabilidad y la producción. Los avances tecnológicos recientes han permitido solventar estos problemas , y el conocimiento y estudio sobre estas nuevas vacunas continúa aumentando.

Las principales ventajas de este tipo de vacunas es que ofrecen la posibilidad de desarrollar vacunas frente a distintos patógenos en un breve periodo de tiempo, sin necesidad de utilizar cultivos celulares y a un costo reducido. Además son capaces de inducir respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, tanto humorales como celulares. El hecho de utilizar ARNm como antígeno vacunal supone una ventaja respecto a las vacunas de ADN al eliminar la posibilidad de integración del ADN en el genoma del huésped. Finalmente, debido a su simplicidad y versatilidad, las vacunas de ARN sintéticas se presentan como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos antígenos vacunales y suponen un candidato ideal para hacer frente a pandemias de gripe o amenazas bioterroristas (37).

Diseño de la vacuna

Actualmente, las vacunas de ARN autoreplicante que utilizan elementos virales que le permiten la autoamplificación *in vivo* ,suponen una alternativa a los vectores de ARNm no replicantes. La autoamplificación del vector *in vivo* permite la traducción y expresión de altos niveles de proteínas durante un tiempo prolongado, lo que supone una gran ventaja respecto a los ARNm no replicantes. Sin embargo, aún sigue siendo necesario mejorar el rendimiento y la producción de estas grandes moléculas , y tener en cuenta la posibilidad de interferencia inmunitaria inducida por el vector (38).

Vías de administración

El ARNm necesita ser administrado a través de vectores virales que permitan su entrada a la célula, ya que, la carga negativa y la inestabilidad de la molécula dificultan su acceso al interior celular . Recientemente se han diseñado sistemas de entrada no virales que incluyen nanopartículas lipídicas, nanoemulsiones catiónicas y mecanismos de electroporación.

El antígeno suele ser administrado mediante inyección con aguja en el músculo esquelético. Algunos estudios señalan que distintos tipos celulares captan espontáneamente el ARNm desnudo y son capaces de iniciar la traducción y expresión de proteínas en el citoplasma en apenas minutos. Sin embargo, tras la inyección solo fracciones muy pequeñas de ARNm desnudo permanecen intactas para poder atravesar la bicapa lipídica y llegar al citoplasma, por lo que el rendimiento de los antígenos protéicos sigue siendo bajo (39).

Es posible que la administración dirigida hacia órganos linfáticos o tipos celulares específicos solventa este problema. La utilización de formulaciones que aumenten la captación del ARN, como los lípidos, o técnicas físicas de aplicación no invasiva como la electroporación suponen una solución potencial. La electroporación es una técnica que consiste en administrar junto al ARN corrientes eléctricas que produzcan un aumento de la conductividad eléctrica y de la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la entrada del ARNm en la célula. Otros métodos más sofisticados consisten en la transfección no viral de células dendríticas *in vitro*, que aumenta la migración y activación de las células presentadoras de antígenos y por tanto la potencia de la vacuna (40).

Producción y distribución

Para la síntesis y producción de los vectores de ARNm se requiere únicamente conocer la secuencia de los ácidos nucleicos. Esto permite desarrollar vacunas contra diferentes agentes infecciosos, eliminando riesgos ambientales y facilitando la distribución de la vacuna en un breve periodo de tiempo y a un costo reducido (41). Además el ARNm puede ser liofilizado, lo que hace posible prescindir de la cadena de suministro de frío y permite su distribución y almacenamiento prolongado a temperatura ambiente (42).

Los avances tecnológicos que se han producido recientemente hacen posible el progreso hacia un diseño racional de la vacuna que permita inducir respuestas inmunes equilibradas, tanto humorales como celulares. Sin embargo aún existen grandes desafíos que incluyen mejorar la eficacia contra patógenos altamente variables, el empleo de tecnología más barata y sostenible para su uso a nivel mundial y mejorar la adaptación y escalabilidad para una producción de emergencia o individualizada (43).

3.4 ADYUVANTES

El adyuvante es una sustancia que al ser administrada conjuntamente con el antígeno vacunal, además de provocar una liberación sostenida del antígeno, potencia de manera no específica la respuesta inmune actuando sobre la respuesta inmune innata y favoreciendo la adaptativa.

Los adyuvantes vacunales se descubrieron en 1926 cuando A. Glenney demostró la actividad potenciadora vacunal de ciertos compuestos de aluminio en sus trabajos con la vacuna de toxoide diftérico. Desde entonces diversas sustancias han sido propuestas y estudiadas con el objetivo de reducir la toxicidad al tiempo que se mantiene la inmunoestimulación (44).

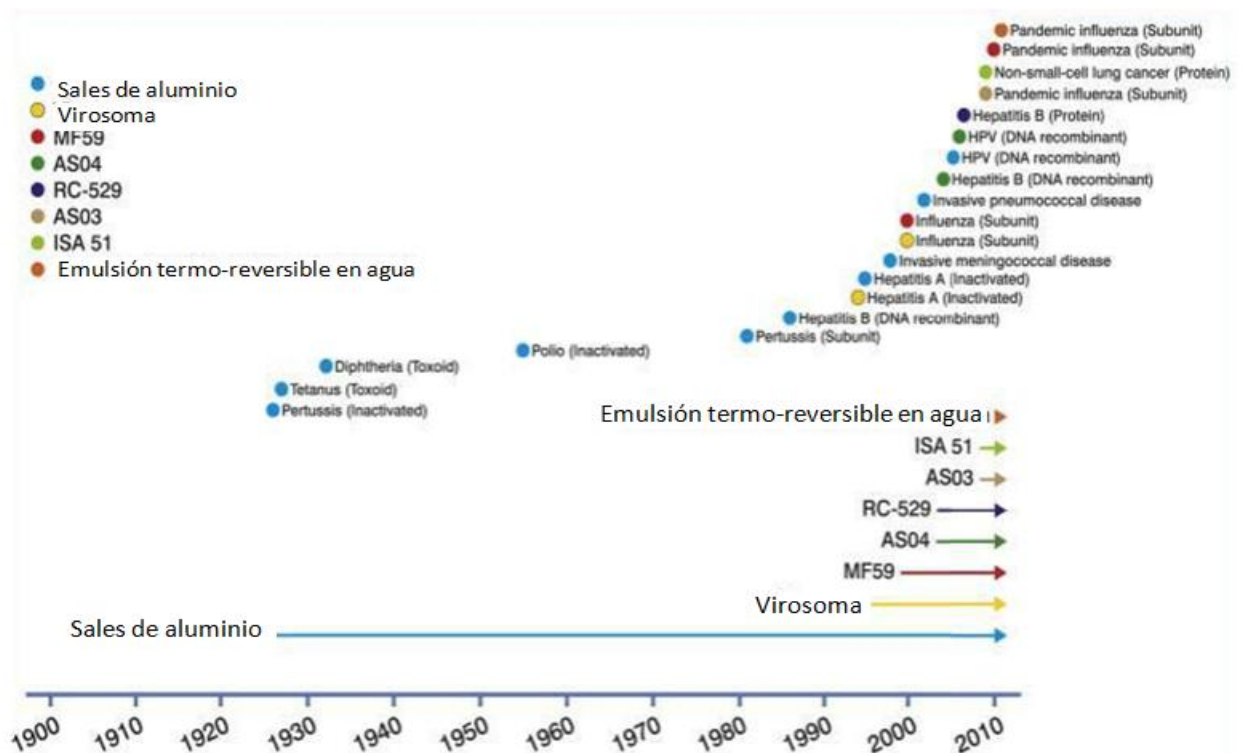


Figura 13: **Evolución histórica del uso de adyuvantes en las vacunas.** Las sales de aluminio han sido los adyuvantes más utilizados y globalmente aceptados desde su descubrimiento hasta la década de 1990. A partir de entonces, comenzó el desarrollo de multitud de nuevos adyuvantes que son comúnmente utilizados hoy en día (Modificado de: 45).

Los agentes infecciosos empleados como antígeno vacunal actúan como un inmunógeno ideal, ya que presentan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos por el sistema inmune innato y necesarios para inducir una respuesta inmune adecuada. Por esto motivo, las vacunas vivas atenuadas no suelen requerir sustancias adyuvantes en su composición, ya que su administración simula una infección natural.

Sin embargo, las vacunas inactivadas (microorganismo entero o subunidad) carecen de estas propiedades, ya que el proceso de inactivación elimina total o parcialmente la capacidad inmunoestimuladora intrínseca que permite desencadenar una respuesta inmune duradera. Las sales de aluminio han sido utilizadas con éxito en la mayoría de las vacunas inactivadas y de subunidad autorizadas hasta la fecha, induciendo una respuesta inmune adecuada y duradera.

Las vacunas de nueva generación basadas en antígenos purificados o recombinantes tienen una inmunogenicidad limitada y por tanto, también requieren del uso de adyuvantes en su formulación. En este caso, las sales de aluminio no siempre son capaces de inducir una respuesta inmune adecuada para estas vacunas por lo que es necesaria la utilización de adyuvantes más complejos. Por este motivo, y ante la creciente necesidad de su uso, uno de los enfoques más prometedores para mejorar la eficacia de estas nuevas vacunas consiste en utilizar adyuvantes más innovadores, incluso combinarlos entre sí dentro de la misma formulación.

Los adyuvantes actúan a través de diferentes mecanismos de acción que siguen siendo desconocidos y estudiados hoy en día, tratándose de un campo de investigación aún en desarrollo. Hasta la fecha no se ha logrado una estrategia para el diseño racional de una sustancia que combine alta eficacia con mínima toxicidad (45).

3.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES

Las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato presentan los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR), dentro de los cuales destacan los receptores tipo Toll (TLR), que han sido los más ampliamente estudiados hasta la fecha. Los PAMPs presentes en los agentes infecciosos son reconocidos por estos receptores, y su activación, junto con otros procesos de inflamación y daño tisular alertan al sistema inmune innato. Esta primera activación del sistema inmune innato es clave para el desarrollo de una respuesta inmune adecuada, ya que, las señales recibidas por las células presentadoras de antígeno tienen gran influencia sobre la cantidad y calidad de las respuestas de los linfocitos T y B, la naturaleza de la respuesta T y la producción de células de memoria.

Tanto las células dendríticas, como los macrófagos y monocitos participan en la presentación del antígeno a las células T, las cuales a su vez promueven la activación y maduración de las células B productoras de anticuerpos neutralizantes. En base a esto, los adyuvantes son capaces de mejorar la respuesta inmune adaptativa al antígeno, amplificando las señales recibidas por las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato (45).

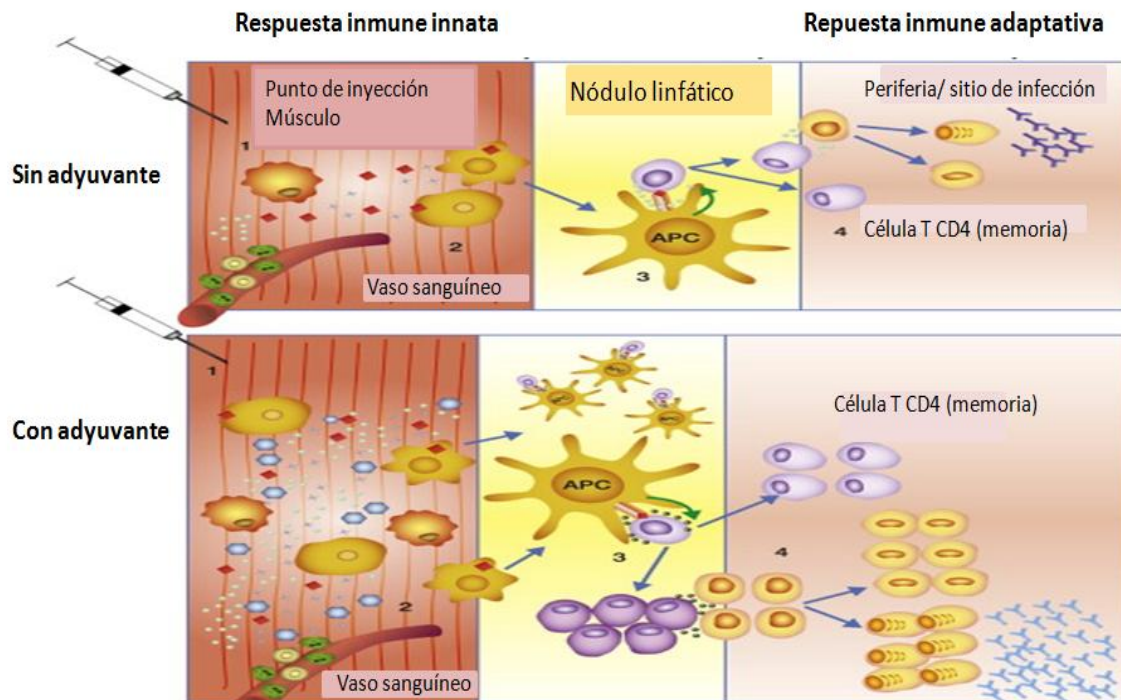


Figura 14: **Mecanismo general de acción de los adyuvantes basado en la evidencia actual.** En primer lugar, el adyuvante imita elementos patógenos de los agentes infecciosos y por tanto es reconocido por el sistema inmune innato. Esto da lugar al reclutamiento de monocitos y células dendríticas inmaduras, y a la liberación de citoquinas proinflamatorias. Las células innatas inmaduras comienzan a madurar hacia células presentadoras de antígeno y se produce una migración hacia ganglios linfáticos de drenaje local donde se activan las células T y B. Esto conduce finalmente a la producción de efectores adaptativos como son los linfocitos T CD4 o células de memoria, y anticuerpos. (Modificado de: 45)

En resumen, el uso de adyuvantes mejora el patrón de citoquinas inducidas, produce una mayor diversidad de células T CD4 memoria y un perfil de anticuerpos más amplio.

3.4.2 ADYUVANTES UTILIZADOS EN VACUNAS AUTORIZADAS

Actualmente existe diversidad de vacunas disponibles que utilizan adyuvantes novedosos o una combinación de los mismos. A continuación revisaremos algunos de los adyuvantes más utilizados.

❖ SALES DE ALUMINIO

Las sales de aluminio son los adyuvantes más utilizados hasta la fecha porque presentan un buen perfil de seguridad y proporcionan estabilidad al antígeno, sin embargo su mecanismo de acción aún es discutido.

Efecto de depósito. En primer lugar forman un depósito que permite la persistencia y liberación gradual del antígeno y además lo presenta de forma multivalente particulada lo que estimula la interacción con las células presentadoras de antígenos. Estudios recientes han mostrado que no siempre es necesaria la absorción del

antígeno en el adyuvante, ya que en muchas ocasiones el fluido intestinal separa el antígeno del adyuvante, y a pesar de no absorberse, el efecto adyuvante se mantiene.

Efecto citolítico. Recientemente se ha demostrado que las sales de aluminio pueden activar directamente las células del sistema inmune innato. Se ha sugerido que las sales de aluminio actúan sobre las células promoviendo la apoptosis y el daño tisular, lo que conduce a la degradación de ácido nucleicos y la consiguiente producción de ácido úrico que podría actuar como un patrón molecular asociado a daño (DAMP) que estimule las células del sistema inmune innato (44).

Estudios recientes han propuesto un segundo mecanismo de acción por el cual el adyuvante activaría *in vitro* los componentes del complejo inflammasoma, un complejo formado por un conjunto de proteínas de la familia NALP. Concretamente su diana serían las proteínas NALP 3, que interaccionan con otras proteínas como las caspasas para formar el complejo inflammasoma y promover la maduración de algunas proteínas proinflamatorias tales como interleucina b-1, interleucina 3 e interleucina 18 (44, 46).

Las sales de aluminio actúan con éxito en vacunas dirigidas contra patógenos donde la respuesta inducida por anticuerpos es la predominante. Algunas de las vacunas autorizadas y empleadas hoy en día utilizan las sales de aluminio como adyuvante. Ejemplo de ello son la vacuna contra difteria, tétanos y tos ferina, y otras vacunas dirigidas contra virus como el virus de la hepatitis B, hepatitis A y el virus del papiloma humano (45).

La principal limitación que tienen las sales de aluminio es el escaso efecto que produce sobre las respuestas mediadas por células T tipo Th1 o citotóxicas, que son especialmente importantes en la respuesta contra patógenos intracelulares (45).

❖ LIPOSOMAS/ VIROSOMAS

Los liposomas son pequeñas vesículas esféricas con un núcleo acuoso formadas por una bicapa de fosfolípidos. Estas vesículas esféricas pueden intercalar antígenos virales en su membrana, y actuar como vehículo de liberación del antígeno, constituyendo lo que denominamos virosoma. (Ver apartado anterior)

Actualmente existen dos vacunas con autorización en Europa y países no europeos que utilizan los virosomas como adyuvante: la vacuna contra la hepatitis A y la vacuna estacional contra el virus *Influenza* (45).

❖ EMULSIONES ADYUVANTES

Las emulsiones adyuvantes esta formadas por aceite y agua, dos sustancias inmiscibles, por lo que para mantener su estabilidad es necesario añadir un surfactante o un emulsionante, típicamente Tween 80 o Span 85 (44). Se han desarrollado dos tipos diferentes de emulsiones, aceite en agua y agua en aceite, denominados así en función de cual es componente minoritario que es dispersado en el componente predominante. Ambos inducen la producción de altos niveles de anticuerpos, pero las emulsiones de aceite en agua suelen tener mejores perfiles de reactogenicidad.

La mayoría de las emulsiones de aceite en agua se basan en escualeno, una sustancia orgánica producida por plantas y que se encuentra además en los órganos y tejidos de muchos animales, incluidos los seres humanos. Sin embargo, es importante destacar que el efecto adyuvante del escualeno solo se observa cuando este está formando parte de una emulsión oleosa (45).

MF59

Algunas emulsiones oleosas, tales como el MF59, fueron desarrolladas ante una posible amenaza de pandemia por el virus *Influenza* H5N1, lo cual promovió numerosas investigaciones con el fin de disminuir la cantidad de antígeno necesario y así aumentar el número de dosis disponible (45).

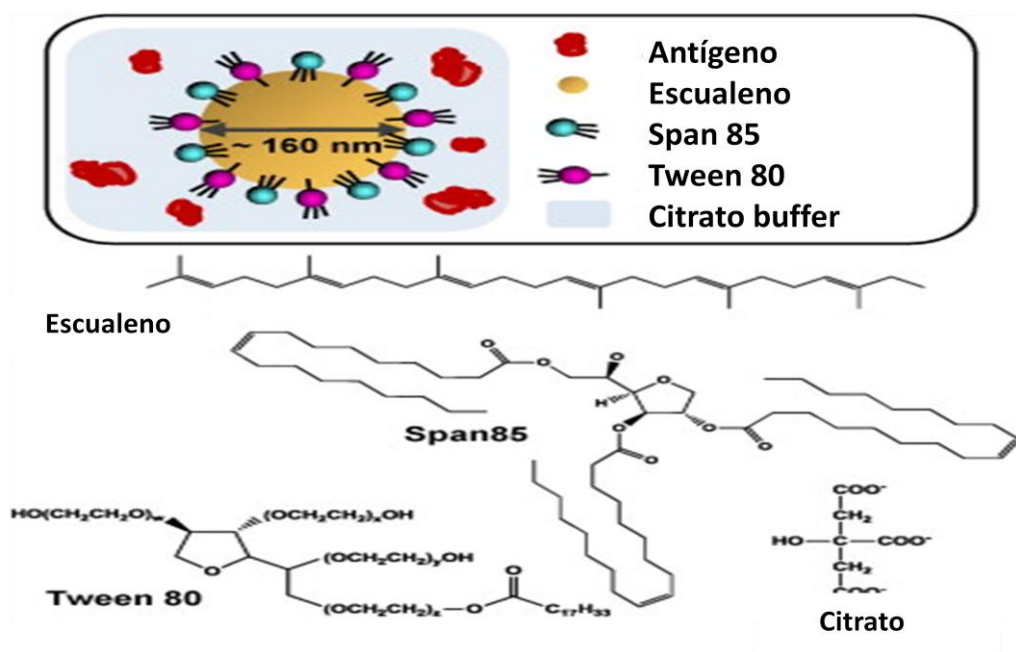


Figura 15: **Estructura de MF59.** MF59 es una emulsión de aceite en agua compuesta por gotas de escualeno que forman un núcleo, que está rodeado por dos surfactantes que le proporcionan estabilidad (Tween 80 y Span 85) y del que se proyectan a modo de espículas las moléculas del antígeno. La actuación de cada componente por individual no ha logrado inducir un efecto adyuvante, por tanto, la integración de todos los componentes que forman la emulsión es necesaria para la activación del sistema inmune (Modificado de: 47)

MF59 aumenta el reclutamiento y la activación de las células presentadoras de antígenos que promueven respuestas inflamatorias, actuando más específicamente sobre los macrófagos que se encuentran en el sitio de inyección. La liberación local de citoquinas estimula el reclutamiento de células inmunes de la sangre al sitio de inyección, creando un bucle de amplificación. MF59 también incrementa la captación del antígeno por parte de los monocitos, favoreciendo su maduración y posterior migración hacia los ganglios linfáticos de drenaje, donde inducirán altos niveles de anticuerpos y la activación de las células T (47).

Algunas vacunas autorizadas contra *Influenza* estacional y pandémica (H5N1) utilizan MF59 en su composición. Este adyuvante mejora las respuestas inmunes en determinados grupos poblacionales como son los ancianos, que están afectados por la senescencia inmune. Además puede inducir respuesta inmune contra variantes específicas producto de la deriva antigénica del virus estacional, que no estén incluidas en la vacuna. Algunos ensayos clínicos muestran que durante el desarrollo de una vacuna contra *Influenza* H5N1 pandémica, la emulsión adyuvante MF59 indujo cierta reactividad cruzada frente a otras cepas relacionadas con el virus. Este hecho puede ser muy relevante en caso de producirse una pandemia, ya que el virus emergente es probable que continúe mutando a medida de avanza la transmisión (45).

❖ COMBINACIÓN DE ADYUVANTES

Las formulaciones que comprenden tres o más adyuvantes han sido diseñadas con el objetivo de inducir respuestas inmunes celulares más potentes.

AS04

La primera combinación de adyuvantes que se desarrolló es la denominada AS04, compuesta por un lipopolisacárido derivado, monofosforil lípido A y sales de aluminio. Gracias a las propiedades del lipopolisacárido, esta combinación de adyuvantes es capaz de producir una estimulación directa de los receptores TLR4. Esto favorece la maduración de las células presentadoras de antígenos que liberan citoquinas que a su vez estimulan la maduración de las células Th, especialmente Th1.

Actualmente dos vacunas autorizadas utilizan AS04 en su composición. La primera vacuna adyuvada con AS04 fue una vacuna contra el virus de la hepatitis B para pacientes en prehemodialisis y hemodiálisis, que respondían pobremente a las vacunas adyuvadas con sales de aluminio. Posteriormente, la vacuna adyuvada con AS04 contra el virus del papiloma humano demostró inducir mayores niveles de anticuerpos en comparación con la vacuna formulada con sales de aluminio. También se observó la producción de cierta reactividad cruzada contra otros serotipos no presentes en la vacuna (45).

3.4.3 CAPACIDAD ADYUVANTE DE LOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS

El ARNm es una molécula capaz de ejercer efectos inmunestimulantes directos debido a sus propiedades adyuvantes intrínsecas. Sin embargo, es posible optimizar racionalmente el efecto adyuvante de estas vacunas modificando su formulación y composición. Por ejemplo, la estabilización contra la degradación inducida por la RNasa, el tamaño de las partículas y su carga influyen en la actividad adyuvante de estas vacunas.

Además los vectores de ARNm codificantes de proteínas pueden ser utilizados como adyuvantes moleculares o genéticos. La expresión del antígeno junto a factores inmunomoduladores como son las citoquinas, aumenta la interacción de las células presentadoras de antígenos con las células efectoras. De este modo, se amplían notablemente las posibilidades de diseño, pero al mismo tiempo también aumentan las dificultades para su entrega y seguridad (43).

3.4.4 Adyuvantes utilizados en vacunas basadas en partículas similares a virus (VLPs)

Las partículas similares a virus (VLPs) consisten en nanoestructuras multiprotéicas ensambladas a partir de proteínas estructurales del virus. En definitiva se trata de bionanomateriales que simulan la conformación de virus auténticos, pero que carecen de cualquier tipo de material genético. El desarrollo de vacunas basadas VLPs ha supuesto un gran impacto en la vacunología moderna, ya que es considerada una estrategia novedosa para hacer frente a virus para los que las tecnologías convencionales no son útiles. Las vacunas basadas en VLP contienen proteínas virales funcionales encargadas de la penetración del virus en la célula, hecho que garantiza una correcta entrada celular y por tanto una selección específica del tejido.

Estas nanopartículas presentan propiedades adyuvantes capaces de inducir respuestas inmunes innatas y adaptativas. Presentan epítopos de células B de alta densidad para la producción de anticuerpos y epítopos intracelulares de células T, lo que les permite inducir potentes respuestas humorales y celulares, respectivamente. Las vacunas basadas en VLPs suponen un sistema de entrega que combina alta inmunogenicidad con un buen perfil de seguridad, presentándose como una novedosa alternativa a las vacunas convencionales basadas en virus vivos atenuados o inactivados (48).

El desarrollo de la primera vacuna contra el *virus del papiloma humano* (VPH) fue posible gracias a las propiedades de la proteína L1 del virus, que fue producida en células de insecto. Esta proteína se agrega para formar partículas similares al virus, que tienen mayor capacidad para producir respuesta inmune efectiva que la proteína en su forma soluble, induciendo la producción de gran cantidad de anticuerpos protectores (2).

Existen algunas vacunas basadas en VLP que ya han sido autorizadas y comercializadas, como es el caso de la vacuna contra el virus de la Hepatitis B y contra el VPH. Sin embargo, la mayoría de las vacunas aún siguen siendo probadas en las distintas fases de los ensayos clínicos (48).

La mayor parte de las vacunas autorizadas utilizan las sales de aluminio como adyuvante, con el objetivo de optimizar la eficacia y seguridad de la vacuna. Sin embargo, para hacer frente a determinados agentes infecciosos o inducir protección en sujetos con un sistema inmune debilitado es necesario optimizar la formulación adyuvante con el objetivo de aumentar la magnitud y duración de la respuesta inmune. Algunos de los nuevos adyuvantes utilizados con este fin son los liposomas, las emulsiones, las toxinas bacterianas y los agonistas de los receptores de reconocimiento de patógenos (49).

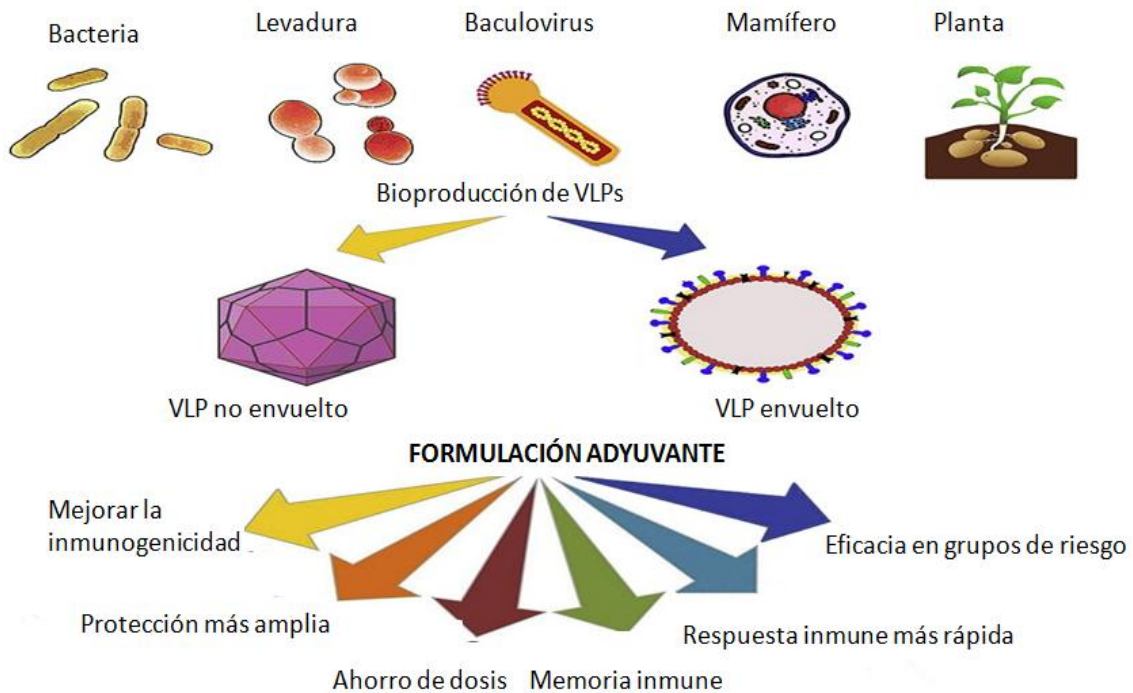


Figura 16: **Producción de vacunas basadas en partículas virales (VLP) y beneficios que aporta la formulación adyuvante.** Las vacunas basadas en VLP pueden producirse utilizando la tecnología del ADN recombinante sobre distintos sistemas celulares como son las bacterias, las levaduras y las plantas. El uso de adyuvantes en la formulación de estas vacunas supone una serie de ventajas. Por un lado mejora la inmunogenicidad de la vacuna, generando una respuesta inmune más rápida y ofreciendo una amplia protección frente a los distintos patógenos. Además crea inmunidad de memoria, disminuye en número de dosis necesaria y es eficaz en pacientes con un sistema inmune debilitado (Modificado de: 49).

Los motivos que impulsan continuar con el estudio y la investigación en el este campo se basan en la multitud de ventajas que aportan los adyuvantes.

3.4.5 VENTAJAS DEL USO DE ADYUVANTES VACUNALES

- Aumentar la seroconversión a través del estímulo de la inmunidad específica, útil especialmente en algunos grupos de riesgo como inmunodeprimidos, ancianos y lactantes.
- Optimizar el antígeno vacunal, disminuyendo la cantidad de antígeno necesario y ampliando así la cobertura vacunal.
- Reducir las dosis de vacunas, mejorando tanto la aceptación de las vacunas por parte de las personas como el coste-beneficio.
- Polarizar y dirigir la respuesta inmune para lograr una mayor efectividad contra ciertas enfermedades.

Sin embargo, el principal obstáculo que ha impedido a los candidatos a adyuvantes avanzar en las distintas fases de los ensayos clínicos ha sido la aparición de efectos secundarios tras la administración de la vacuna. Por este motivo, y gracias a los avances en inmunología y toxicología, actualmente se trabaja para un diseño racional de los candidatos a adyuvantes.

Se han descrito numerosas manifestaciones de toxicidad con el uso de adyuvantes, pero las más frecuentes son las reacciones adversas en el lugar de administración debido a su efecto irritante. Sin embargo, la lisis e inflamación local también aumentan la inmunoestimulación gracias a la liberación de moléculas endógenas de peligro que se producen durante la necrosis tisular, por lo que debemos buscar el equilibrio entre la toxicidad producida y la inmunoestimulación deseada.

También se han descrito reacciones de hipersensibilidad retardada debida al efecto de depósito de algunos adyuvantes, que a su vez juega un papel importante en la inmunoestimulación. Sin embargo, algunos estudios apuntan que la adsorción del antígeno al hidróxido de aluminio no es determinante para el incremento de la respuesta inmune adaptativa, y con el objetivo de reducir su toxicidad propusieron emplear adyuvantes biodegradables y nanopartículas.

Otra de las posibles reacciones adversas de los adyuvantes son las reacciones de autoinmunidad. Con el fin de disminuirlas, se ha propuesto como estrategia la eliminación de epítomos que mimeticen con estructuras propias. Además los nuevos avances en bioinformática permiten comparar las secuencias de una vacuna peptídica con secuencias propias y calcular un riesgo potencial de inducción de autoinmunidad.

Hoy en día siguen siendo desconocidos algunos de los mecanismos de acción y toxicidad de estas sustancias, por lo que es importante promover investigaciones con el fin de alcanzar un diseño racional que permita obtener un adyuvante eficaz a la vez que seguro (44).

4 VACUNAS FRENTE A VIRUS ALTAMENTE MUTABLES

A pesar de los numerosos avances que se han producido en el campo de la inmunización, aún persisten retos importantes. Uno de los más destacados consiste en desarrollar vacunas eficaces contra virus que presentan elevada variabilidad genética, como es el virus *Influenza* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La alta variación genética que presentan se debe principalmente a dos motivos. En primer lugar, cuando dos o más virus con genomas distintos infectan la misma célula, pueden intercambiar su material genético en un proceso denominado “recombinación o cambio antigénico”, dando lugar a un nuevo virus con un genoma distinto al de sus progenitores (50).

Por otro lado, estos virus con genomas ARN presentan elevada tasa de mutación espontánea durante la replicación viral. Esto se debe fundamentalmente a que la ARN polimerasa encargada de copiar el material genético durante la replicación del virus, no corrige los errores que se van produciendo, a diferencia de la ADN polimerasa que sí los corrige (50, 51).

A continuación expondremos algunas de las técnicas utilizadas para la producción de vacunas contra la gripe y las estrategias empleadas en los distintos ensayos clínicos en busca de una vacuna eficaz contra el VIH.

4.1 VACUNAS CONTRA LA GRIPE

Actualmente se utilizan tres métodos para producción de vacunas contra el virus *Influenza* aprobadas por la FDA.

❖ Vacunas producidas en huevos embrionados

Este método ha sido empleado durante más de 70 años y es el más utilizado para elaborar vacunas contra el virus *Influenza*. Tanto la vacuna inactivada inyectable como la vacuna viva atenuada intranasal, emplean este método para su producción.

En primer lugar se produce la selección de las cepas de los virus candidatos a la vacuna y se cultiva en huevos embrionados durante unos días. El cultivo resultante se inyecta en huevos de gallina fertilizados, donde se produce la replicación del virus durante el tiempo de incubación. Finalmente se obtiene el líquido que contiene los virus. En este momento podemos inactivar químicamente los virus y posteriormente purificar el antígeno para la producción de la vacuna inactivada inyectable. Por el contrario, para la obtención de la vacuna viva atenuada, los virus iniciales introducidos en los huevos de gallina debían haber sido previamente atenuados.

Los principales inconvenientes que plantea este método es la enorme cantidad de huevos de gallina necesarios para la elaboración de la vacuna y el largo periodo de tiempo que conlleva su producción (52).

❖ Vacunas producidas en células

Este método fue aprobado por la FDA en 2016 y la principal diferencia respecto al método anterior es que los virus son cultivados en células de mamíferos, en lugar de en huevos de gallina. Este método surgió como una alternativa al cultivo en huevos, ya que la técnicas empleadas permiten una mayor flexibilidad para la producción, y además la vacuna resultante ofrece una mayor protección debido a la similitud que presentan los virus obtenidos del cultivo con los que circulan en la naturaleza.

En primer lugar la cepa viral es seleccionada y se inyecta normalmente en un cultivo de células renales de mamíferos para que virus se multiplique durante unos días . Posteriormente las paredes celulares son retiradas y se obtiene el líquido que contiene los virus. El virus es inactivado y se purifica el antígeno. El proceso continúa con más etapas de purificación y de prueba. Una de las mayores ventajas que ofrece esta técnica es la capacidad para elaborar vacunas en cuestión de semanas, lo que podría ser muy beneficioso para producir vacunas con rapidez en caso de pandemia. Figura 20. Supone una ventaja frente a la vacuna obtenida en huevos embrionados al no presentar contaminaciones con proteínas de huevo que no se podrían utilizar en personas alérgicas a proteínas del huevo (52).

Nueva tecnología para producción de vacunas

La nueva producción de vacunas basada en células podría reemplazar la producción tradicional para satisfacer la necesidad de actuar con rapidez en emergencias y salvar millones de vidas en caso de una pandemia. Las células pueden congelarse y almacenarse con antelación a un brote.

MÉTODO TRADICIONAL EN HUEVOS



PRODUCCIÓN DE VACUNAS CON BASE EN CÉLULAS



Figura 17: **Métodos empleados para la producción de vacunas contra el virus Influenza.** El método tradicional utiliza huevos de gallina fertilizados como sustrato para la multiplicación del virus, que será posteriormente inactivado y purificado para emplearse como antígeno en la vacuna. Recientemente se ha aprobado un nuevo método de producción que utiliza un cultivo de células de mamíferos para la replicación del virus, lo que permite fabricar vacunas con mucha mayor rapidez que con el método convencional. (Luisa Fernanda Gomez. Vacunas Genéticas. El ADN en la Ingeniería Biomédica. 2014.)

❖ Vacunas recombinantes

La tecnología recombinante tampoco utiliza huevos para su producción. Primero se aísla el gen de la hemaglutinina (HA) de un virus de tipo salvaje. El gen de la HA posteriormente se recombina con otros genes de virus que crecen en células de insecto. El nuevo virus recombinado se cultiva en células de insecto para su replicación. Finalmente la proteína HA del virus se extrae de las células y es purificada. Este método nos permite fabricar vacunas a gran velocidad ya que no está limitado por la necesidad de seleccionar virus adaptados a los distintos cultivos (53).

4.2 DESARROLLO DE VACUNAS EXPERIMENTALES CONTRA EL VIH

El desarrollo de una vacuna preventiva contra el VIH sigue siendo un desafío importante desde que el virus fue descubierto en 1981. Numerosos estudios y estrategias han sido utilizadas hasta la fecha, pero ninguna de ellas ha resultado lo suficientemente eficaz como para conferir protección completa frente al virus.

El VIH presenta una serie de retos específicos para el desarrollo de vacunas. En primer lugar nadie se recupera naturalmente de una infección por VIH, por lo que es difícil conocer los mecanismos de respuesta inmune eficaces contra el virus. Un segundo reto importante es la altísima tasa de mutabilidad del virus y la multitud de serotipos existentes, lo que hace difícil crear una vacuna que proteja contra todos los serotipos. Por último, se desconoce cómo van a funcionar las vacunas experimentales probadas en animales en el huésped humano.

Con el objetivo de aumentar la respuesta inmune específica contra el VIH, algunos ensayos clínicos han evaluado la eficacia de una estrategia que consiste en la combinación de una vacuna de ADN con una vacuna viral basada en proteínas recombinantes. La vacuna de ADN es utilizada para la inmunización inicial y es capaz de activar las células T e inducir respuestas celulares. El uso posterior de una vacuna basada en proteínas recombinantes actuaría como refuerzo e induciría la producción de anticuerpos específicos contra el virus, estableciéndose una buena respuesta de tipo humoral. El ensayo clínico denominado RV144, utilizó en primer lugar una vacuna de ADN que contenía múltiples antígenos del virus, seguido de una vacuna viral recombinante que codificaba para la proteína gp120. Este nuevo enfoque heterogéneo de estimulación demostró tener una eficacia del 31% para prevenir la infección por el VIH-1, pero modificó la carga viral de los sujetos no protegidos (54, 55).

Por otro lado, un ensayo clínico en fase I combinó un cebado de ADN portador de múltiples antígenos con un refuerzo viral constituido por una vacuna basada en un adenovirus recombinante. Este ensayo demostró que las vacunas producían una acción sinérgica que mejoraba la magnitud de las respuestas de células T CD8, además de mejorar la calidad de la respuesta humoral. Actualmente se está evaluando la eficacia de este nuevo enfoque para disminuir la carga viral en pacientes infectados tras la vacunación. Otros vectores virales, como el virus vaccinia ankara modificado, también están siendo estudiados como posibles candidatos para el desarrollo de una vacuna contra el VIH-1 (33).

La incorporación de nuevas vías de administración y el empleo de adyuvantes moleculares ha impulsado la realización de nuevos ensayos clínicos. Uno de los más prometedores utiliza una vacuna de ADN administrada mediante electroporación, que codifica para las proteínas gag, pol y env del VIH-1, y un adyuvante molecular que sintetiza IL-12. El adyuvante molecular no solo aumenta la magnitud de la respuesta inmune, sino que además es capaz de dirigir a las células T efectoras específicas del antígeno hacia tejidos diana como es la mucosa intestinal, con el objetivo de amortiguar mejor la replicación viral inicial (33).

A pesar de las investigaciones realizadas, a día de hoy no existe todavía una vacuna eficaz contra el VIH. Sin embargo, los esperanzadores resultados que se han obtenido en los últimos ensayos clínicos hacen que numerosos grupos de investigadores estén colaborando activamente en lo que se ha convertido en un esfuerzo global para desarrollar una vacuna contra el VIH.

5 VIRUS EMERGENTES

5.1 VIRUS DEL ÉBOLA

El virus del Ébola (VE) es un virus con envoltura que pertenece a la familia *Filoviridae*, cuyo material genético consiste en una molécula de ARN monocatenario que codifica para siete proteínas estructurales que forman el virión. Es el causante de la enfermedad por virus del Ébola, consistente en una fiebre hemorrágica viral potencialmente mortal y que puede afectar tanto a humanos como animales. Existen hasta cinco cepas del virus, siendo las más conocidas las cepas Zaire y Sudan responsables de la mayoría de casos de enfermedad en humanos (56).

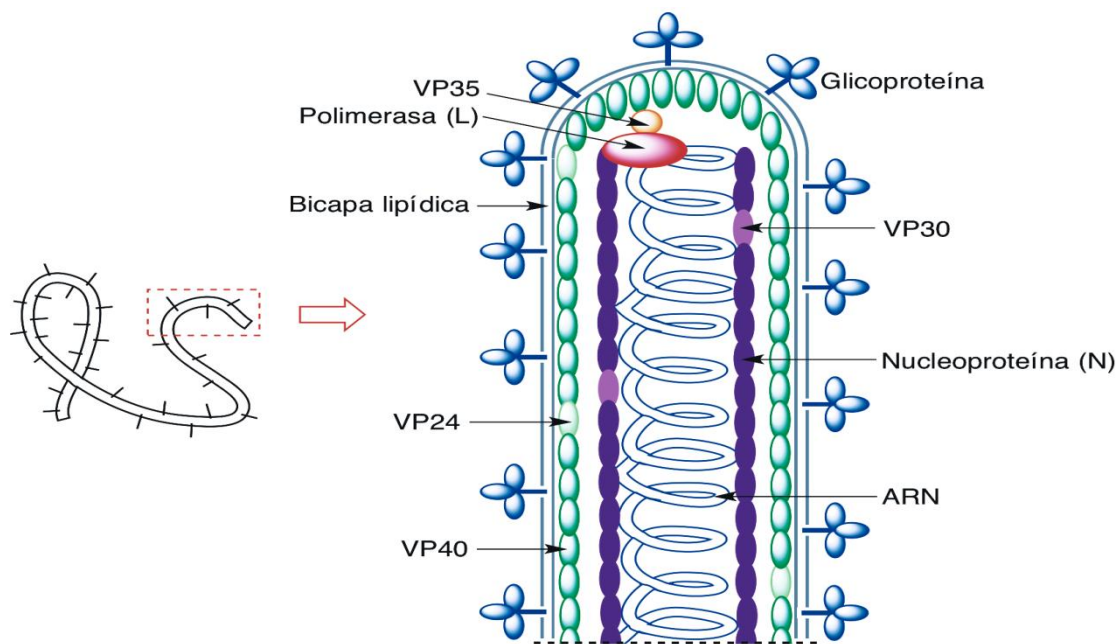


Figura 18: **Estructura molecular de un virión del VE.** El ARN del VE contiene 7 genes que codifican para 7 proteínas estructurales: la nucleoproteína actúa como cápsula que protege el material genético. La proteína VP35 junto con la polimerasa son responsables de la síntesis y replicación del ARN. La proteína VP40 es la denominada proteína de la matriz y tiene función de ensamblaje y control de la salida de viriones. La glicoproteína actúa como receptor de membrana y participa en la internalización del virus en células sanas. El factor de transcripción VP30 controla el reinicio del proceso de replicación. Finalmente la proteína VP24 parece ser la responsable de bloquear las vías intracelulares que activan la respuesta inmunitaria y por tanto permite al virus evadir el sistema inmune del huésped (57).

El primer brote ocurrió en la República Democrática del Congo en 1976. No fue hasta 2014 cuando se presentó como una epidemia sin precedentes en África Occidental, transmitiéndose durante muchos meses en estos países y produciendo brotes secundarios en entornos de atención médica en España y Estado Unidos. La alarma mundial producida, con casi 12.000 fallecidos hasta la fecha, impulsó el desarrollo de nuevos tratamientos experimentales y avances en el desarrollo de vacunas para su prevención (56).

El VE es capaz de activar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo. El interferón (IFN) es uno de los elementos fundamentales de la respuesta inmune innata frente a este virus, ya que bloquea tanto la internalización como la replicación viral. Sin embargo, la interacción del virus con el huésped y más concretamente la proteína VP24 del VE, interfiere en múltiples niveles con la producción del IFN, reduciendo así la respuesta inmune innata y favoreciendo la infección celular (56).

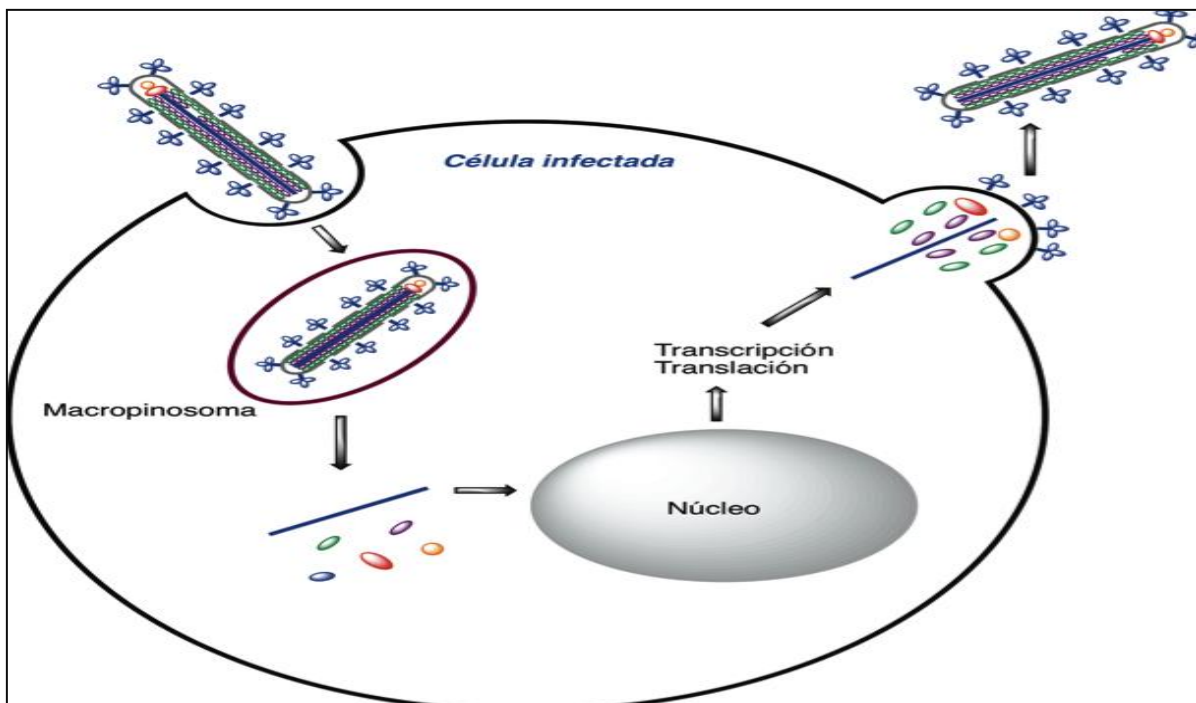


Figura 19: **Ciclo vital del VE.** El virión alcanza la superficie celular y entra en el citoplasma en grandes vesículas endocíticas denominadas macropinosomas. Una vez allí, el material genético se traslada al núcleo donde se inicia el proceso de replicación y transcripción. Las proteínas estructurales sintetizadas se autoensamblan para dar lugar a nuevos viriones que salen al exterior (57).

Hoy en día no existe un tratamiento específico eficaz contra el virus del Ébola. Un tratamiento de soporte adecuado, basado fundamentalmente en la reposición hidroelectrolítica agresiva y en la prevención de las complicaciones del shock, es la única medida con resultado eficaz para la mejora de la supervivencia. La falta de un tratamiento específico y la alarma social desatada por la gran epidemia ha impulsado la investigación y el desarrollo de algunos candidatos a vacunas. (56).

5.2 VIRUS ZIKA

El virus del Zika es un *flavivirus* que se transmite a humanos a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, relaciones sexuales o contacto con la sangre. Fue descubierto en Uganda en 1947 y desde entonces, el virus se ha propagando y ha aumentado su alcance geográfico pasando de África ecuatorial a Asia y finalmente al continente americano en 2015. La continua expansión del vector está facilitada por distintos factores como el calentamiento global, las lluvias torrenciales y las extensas áreas de pobreza, haciendo que hasta la fecha se hayan notificado casos hasta en 31 países en América (58)

El virus del Zika tiene un neurotropismo significativo y es capaz de infectar neuronas y células gliales. Las células progenitoras neuronales son su principal objetivo, afectando a la neurogénesis y provocando la muerte celular. Por este motivo, el auge de la propagación del virus Zika en Brasil ha producido un incremento sin precedentes del número de niños que nacen con hidrocefalia, además de un considerable aumento del número de casos del síndrome de Guillain- Barré. Estas consecuencias clínicas devastadoras demandan de forma urgente el desarrollo de vacunas y otras medidas de prevención (59).

En las infecciones por virus Zika, la inmunidad humoral mediada por anticuerpos neutralizantes es la predominante, aunque también tiene un importante papel los linfocitos T CD4 que lisan las células infectadas. A día de hoy no existe un tratamiento de eficacia comprobada contra el virus, y los nuevos candidatos a vacunas están en fase de estudios preclínicos. En todos los ensayos clínicos llevados a cabo para evaluar la eficacia de la vacuna resulta fundamental cuantificar la respuesta de anticuerpos, así como evaluar su seguridad en embarazadas.

A la hora de desarrollar una vacuna contra el virus Zika es importante tener en cuenta que a pesar de los distintos serotipos que presenta, la respuesta de anticuerpos es ampliamente protectora, a diferencia de lo que ocurre con otros virus como el dengue donde la inmunidad frente a un serotipo no protege frente a otros.

Desarrollo de nuevas vacunas ensayadas para virus emergentes (EBOLA, ZIKA, etc. :)

Varias vacunas candidatas están en desarrollo actualmente. Estas incluyen vacunas de virus vivos atenuados, virus purificados inactivos, vacunas de ADN y ARNm y vacunas virales basadas en vectores virales (virus *Vaccinia* modificado, virus del sarampión, adenovirus). Los esfuerzos de múltiples laboratorios han conducido a un ritmo sin precedentes en el desarrollo de vacunas virales. Por regla general, y dada la importancia que la respuesta humoral tiene a la hora de controlar la infección y propagación viral, se buscan preferentemente antígenos de la superficie viral.

-Vacunas inactivadas: Los viriones purificados inactivados del virus Zika han mostrado tener una buena actividad inmunogénica, sin embargo, se necesitan estudios adicionales especiales para comprobar la seguridad de este tipo de vacunas en inmunodeprimidos y embarazada (59).

-Vacunas atenuadas vivas recombinantes: Se han utilizado vectores recombinantes como el virus de la fiebre amarilla que ha sido atenuado genéticamente y al que se le ha introducido los genes codificantes de antígenos patógenos del virus Zika. El objetivo de la atenuación es conseguir un equilibrio entre inmunogenicidad y seguridad, siendo especialmente importante en este caso evaluar la neurovirulencia. Estas vacunas inducen respuestas humorales y celulares potentes.

-Vacunas de partículas semejantes a virus: “virosonas”: Este tipo de vacunas están compuestas por proteínas estructurales del virus estructuradas en partículas semejantes a virus, por lo que al carecer de material genético no se replican y presentan una alta seguridad (60).

-Vacunas basadas ácidos nucleicos: Las vacunas de ADN están compuestas por un plásmido que contiene una secuencia de ADN codificante para el antígeno de interés, además de una secuencia promotora y otra de poliadenilación que facilitan la transcripción y la traducción de proteínas respectivamente. Algunas vacunas de ADN dirigidas contra el virus Zika utilizan los genes de las proteínas de la pre-membrana (prM) y de envoltura (E) del virus para codificar las correspondientes proteínas que serán utilizadas como antígenos en la vacuna (59,60).

DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA EL ÉBOLA

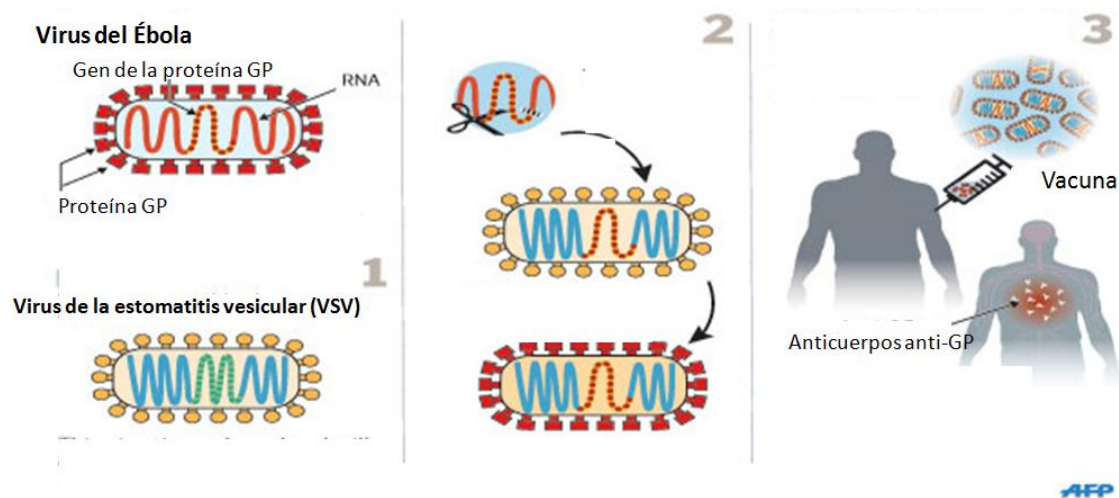


Figura 20. **Desarrollo de la vacuna vectorial frente al virus ÉBOLA.** Fase 1: El virus del Ébola ataca las células humanas uniéndose a ellas mediante la proteína GP que está en su superficie. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) está atenuado y por lo tanto no produce enfermedad. Fase 2: el gen de la proteína GP del Ébola se inserta en el genoma del VSV sustituyendo a la proteína de superficie de este virus. Fase 3: la vacuna resultante expresa la proteína GP del virus Ébola e induce la producción de anticuerpos contra GP, protegiendo de esta forma al individuo. (Modificado de Hospital Universitario de ginebra / OMS).

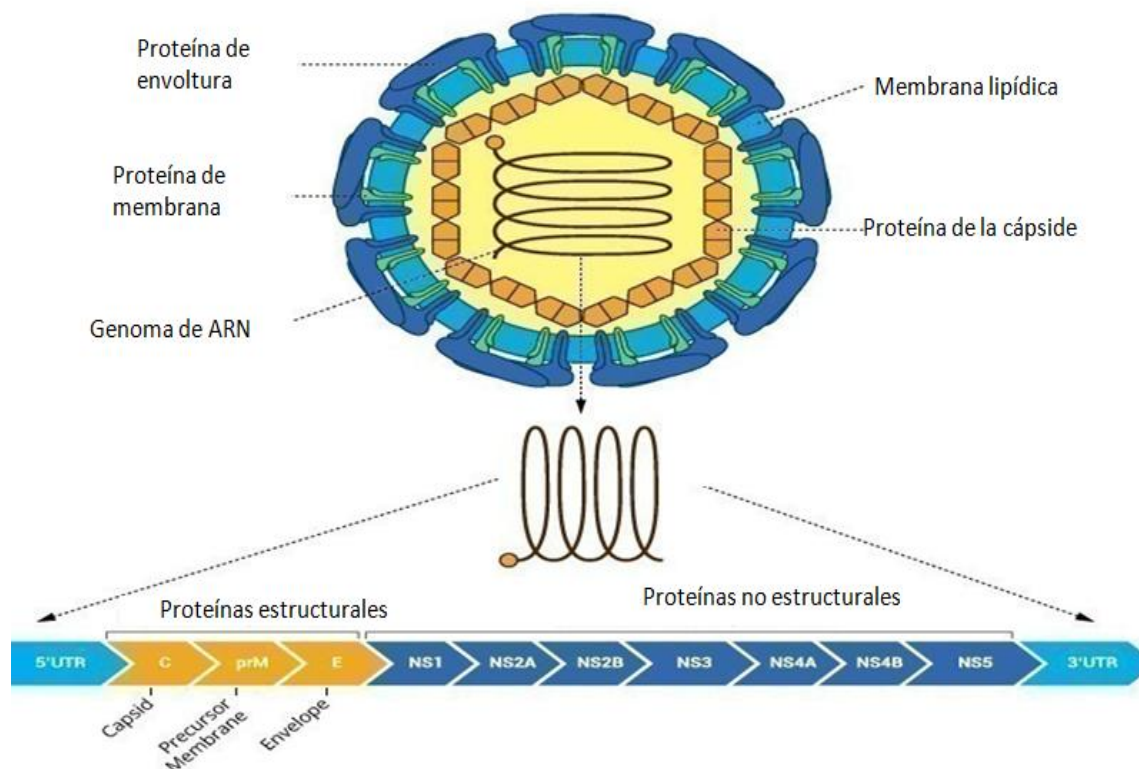


Figura 21: **Estructura molecular del virus Zika.** El ARN monocatenario del virus Zika codifica para proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales codificadas son tres: proteína de la cápside (C), proteína precursora de membrana (prM) y proteína de envoltura (E). Las proteínas E del virus (que interacciona con receptores de la membrana de la célula huésped y facilita la invasión celular) y la proteína prM (encargada del ensamblaje de viriones maduros y que puede estar relacionada con la neurovirulencia) son utilizadas como inmunógeno en las vacunas de ADN. (Nicole Sandler, Aaron Wardell. Zika: Personal Perspectives, Global Responses. Promega Corporation. 2019)

Existen 13 ensayos clínicos abiertos hasta la fecha que prueban una variedad de conceptos de vacunas Zika, que incluyen las vacunas de ADN, vacunas de ARNm y vacunas basadas en vectores virales. En general, los antígenos seleccionados fueron moléculas de proteínas ubicadas en la superficie del virus. En menos de un año, los estudios preclínicos de prueba han demostrado que las vacunas de ADN, las vacunas purificadas de virus inactivados y las basadas en vectores recombinantes brindan una fuerte protección en modelos animales. Además, estudios de transferencia adoptiva han demostrado que la protección podría estar mediada por anticuerpos inducidos por la vacuna (61).

6. EL FUTURO DE LA INMUNIZACIÓN

La metodología clásica de producción de vacunas que ha predominado hasta finales de 1990 estaba basada en un procedimiento empírico. Este método ha dado buenos resultados, llegando incluso a lograr la erradicación de la viruela a nivel mundial, sin embargo hoy en día existen numerosas razones por las cuales ya no es útil. En primer lugar, los costosos ensayos clínicos de seguridad y eficacia así como el elevado precio al que se comercializan las vacunas favorecen las coberturas vacunales bajas. Además suele ser necesario el mantenimiento de la cadena de suministro de frío lo que supone un problema en muchos territorios. En segundo lugar, el método clásico ignora la genética poblacional y los riesgos genéticos individuales que puedan favorecer algún efecto adverso de la vacuna. Por último, estas vacunas no son útiles frente a virus altamente variables y patógenos complejos que suponen una amenaza hoy en día.

Actualmente, gracias al avance de las nuevas tecnologías, el desarrollo de las vacunas sigue un nuevo paradigma: descubre – caracteriza – aplica. De este modo, los nuevos enfoques o estrategias para crear candidatos a futuras vacunas se centran en tres aspectos (37):

- El estudio genómico del agente infeccioso.
- El estudio de la respuesta inmune frente a estos microorganismos.
- El descubrimiento de nuevas vías de administración.

Las distintas estrategias utilizadas no solo se complementan entre sí, si no que llegan incluso a solaparse, y será la combinación de las mismas las que den lugar a las vacunas del futuro. Por tanto los objetivos que se persiguen en el desarrollo de futuros candidatos a vacunas son los siguientes:

6.1 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ANTÍGENOS PROTECTORES.

Vacunología inversa

Los avances informáticos que se han producido en las últimas décadas han hecho posible el conocimiento de la secuencia completa de los genomas de muchos microorganismos, marcando el inicio de la “vacunología inversa”. El análisis genómico mediante herramientas bioinformáticas permite identificar proteínas capaces de inducir una respuesta inmune protectora. Una vez identificados los antígenos candidatos a vacunas, se amplifica la secuencia de genes mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Posteriormente se clonan, expresan y purifican, y las proteínas recombinantes resultantes son utilizadas como antígeno vacunal (2). De esta manera se pueden obtener vacunas de subunidades que incorporen varias proteínas en su forma natural y por tanto tengan un mayor efecto neutralizante (37).

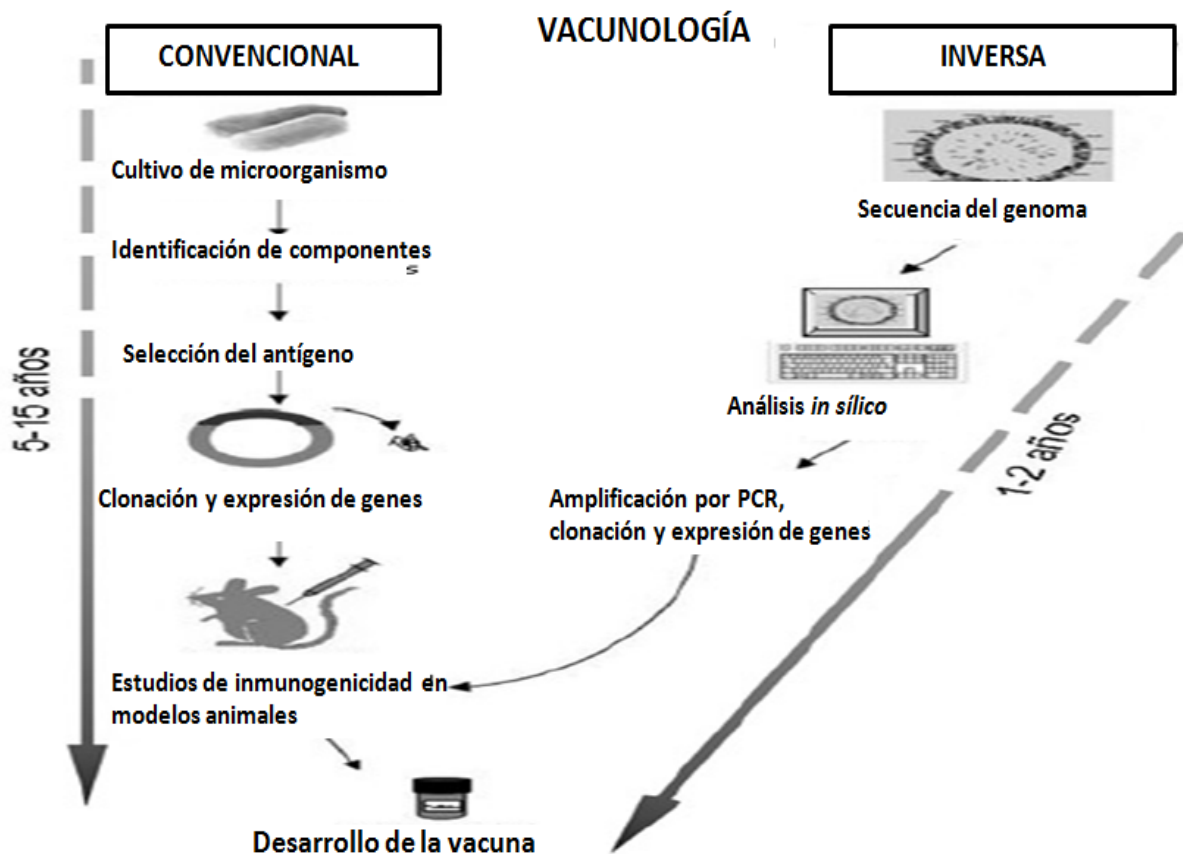


Figura 22: **Vacunología convencional vs. Vacunología inversa.** El conocimiento de la secuencia completa del genoma de muchos microorganismos, posibilita la selección de nuevos antígenos vacunales que no pueden ser encontrados por métodos convencionales. Los genes de dichos antígenos son amplificados por PCR para posteriormente ser clonados, expresados y purificados como proteínas recombinantes que serán utilizadas para inmunizar animales de experimentación con el fin de evaluar capacidad inmunogénica. Las principales ventajas que supone el empleo de la vacunología inversa son la reducción del tiempo necesario para el desarrollo de la vacuna y la posibilidad de encontrar antígenos vacunales para microorganismos no cultivables (Modificado de: 62)

Vacunología estructural

La vacunología estructural en base al conocimiento de la secuencia de aminoácidos y de las estructuras secundaria y terciaria de ciertas proteínas, se encarga de seleccionar y diseñar epítopos antigénicos que sean capaces de estimular una respuesta inmune adecuada (63). En algunas ocasiones el estudio de una estructura cristalizada del complejo antígeno-anticuerpo podría utilizarse como punto de partida para obtener el producto final. Por tanto, puede ser de gran utilidad contra patógenos intracelulares ya que identifica ciertas estructuras que pueden determinar la unión y entrada del agente infeccioso a la célula (64).

Esta estrategia se complementa con la vacunología inversa y una de sus potenciales aplicaciones es el desarrollo de una vacuna contra el VIH que emplea la proteína Env como antígeno en la vacuna (63).

Inmunómica

La *inmunómica* es una estrategia que utilizando el conocimiento del genoma completo de un microorganismo y muestras biológicas derivadas de individuos que han superado la infección, permite la selección de genes que codifican péptidos capaces de unirse fuertemente a los receptores de los linfocitos estimulando de esta manera la respuesta inmunológica. Unas de sus principales ventajas es la capacidad para seleccionar antígenos inmunógenos aunque estos no sean dominantes, e incluso es posible detectar antígenos que escapan a la genómica (65).

6.2 ADQUISICIÓN Y POTENCIACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA VACUNA.

Vacunómica

La *vacunómica* está basada en el estudio de la genética y epigenética de los individuos, así como de otros factores que participan en el procesamiento de los antígenos y de polimorfismos genéticos que puede influir en las variaciones de la respuesta inmunitaria a las vacunas. Por tanto, se trata de una estrategia que no solo permite la evaluación de la respuesta inmune, sino que además es capaz de predecir posibles efectos adversos a las vacunas (66).

En base a este conocimiento es posible el desarrollo de vacunas personalizadas dirigidas tanto a un individuo concreto, como a un grupo poblacional determinado en función de la frecuencia de haplotipos y de tipos de genes HLA (67).

Sistemas de entrega

Los denominados *sistemas de entrega* son en definitiva una estructura física que asegura la presentación del antígeno al sistema inmunológico y por tanto hace incrementar su inmunogenicidad. Algunas de las ventajas que aportan este tipo de sistemas son:

- Permiten incorporar varios antígenos distintos de manera segura. Algunos bacterias y virus que han perdido su virulencia, o diferentes partes de estos, pueden utilizarse como vehículo de transporte de vacunas al incorporarles antígenos en su superficie.
- Permiten solventar el problema de administración de vacunas de ADN. Un tipo de sistema de entrega está representado por los *sistemas espirales* que consisten en una estructura de multicapas de fosfolípidos que han sido utilizadas para facilitar el paso de vacunas de ADN a través de las membranas. Otra de sus características es la resistencia a la degradación que en consecuencia aumenta la estabilidad y el tiempo de liberación del antígeno, lo que les hace especialmente interesantes en el desarrollo de vacunas vía mucosa. Recientemente se ha ensayado un *sistema de microencapsulación en*

polímeros biodegradables que son absorbidos a través de la mucosa intestinal, y que proporcionan una liberación lenta y programada del antígeno que incluso permite prescindir de dosis adicionales de vacuna (68).

- Algunos son capaces de actuar a la vez como adyuvantes. Los *virosomas*, vesículas esféricas formadas por capas de fosfolípidos a los que se unen las glucoproteínas del virus previamente seleccionado, podrían tener un papel importante en el desarrollo de una vacuna contra la malaria o la hepatitis C (69).

6.3 DESARROLLO DE NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.

Las campañas de vacunación infantil han reducido considerablemente las tasas de mortalidad y morbilidad por enfermedades infecciosas en la mayoría de países desarrollados. Uno de los desafíos actuales consiste en encontrar vacunas eficaces que puedan ser utilizadas en países del mundo donde la infraestructura es muy precaria, ya que en muchas ocasiones existiendo vacuna esta no puede ser aplicada por numerosas razones:

- El alto precio al que se comercializan las vacunas y la escasez de recursos económicos en estos países.
- La financiación inadecuada y la falta de sistemas nacionales de vacunación eficiente.
- La creciente complejidad de las nuevas vacunas y los recursos tecnológicos limitados con los que cuentan estos países.
- La falta de sistemas adecuados de administración, distribución, transporte y almacenamiento de la vacuna también dificultan su acceso.

El desarrollo de vías de administración más seguras y no invasivas, como las vacunas comestibles, mucosas o transcutáneas, favorece una mejor aceptación poblacional de la vacuna y por tanto mayor nivel de cobertura vacunal. Además, la cadena de suministro de frío podría no ser necesaria en algunos casos lo que facilitaría el almacenamiento y distribución de la vacuna a territorios poco accesibles. Por último, las técnicas de fabricación de algunas de estas nuevas vacunas podrían resultar más sencillas y baratas, lo que incrementa la probabilidad de que puedan ser producidas en países en vías de desarrollo (37).

Las mucosas son lugares de alta actividad inmunológica, lo que hace que las *vacunas mucosas* sean ideales contra microorganismos con esa puerta de entrada donde la inmunidad local juega un papel importante. El principal desafío es evitar la tolerabilidad sistémica periférica que impediría el reconocimiento del antígeno y por

tanto la producción de anticuerpos. Recientemente se ha utilizado la vía nasal en una vacuna contra la gripe que ha demostrado inducir una respuesta inmune más rápida, completa y duradera que la vacuna inyectable.

Las vacunas *transcutáneas* pueden ser administradas a través de inyectores sin aguja que permeabilizan el estrato córneo de la piel introduciendo líquido a altas presiones, como es el caso de la “pistola genética”. La utilización de parches con micro-agujas inyectables es otra posibilidad. Las principales ventajas de este tipo de vacunas es que permiten una liberación sostenida del antígeno en el tiempo, la posibilidad de utilizar varios antígenos simultáneamente y la facilidad para ser auto-administrada (37).

Los nuevos avances en ingeniería genética permiten introducir determinados genes de un agente infeccioso en el ADN de plantas con el fin de que los expresen en los alimentos. Surge así el concepto de *vacunas comestibles*, en las cuales el alimento crudo actúa como vector para la expresión del antígeno que induce una respuesta inmune. Ha sido posible expresar antígenos del virus del papiloma humano y VIH entre otros, pero son necesarios más estudios para aumentar la estabilidad, mantener la tolerabilidad de los antígenos alimentarios y prevenir la posible transformación del antígeno en el alimento (70).

CONCLUSIÓN

La combinación de las diferentes estrategias comentadas anteriormente ha permitido el desarrollo de nuevos tipos vacunas como son las vacunas recombinantes, las vacunas recombinantes basadas en vectores o las vacunas de ADN y ARN. A pesar de la alta eficacia de estas vacunas, algunas estrategias como la vacunómica nos permitirán determinar los genotipos y fenotipos individuales, y de este modo correlacionar algunos polimorfismos poblacionales con la probabilidad de sufrir determinadas infecciones, estimar la respuesta inmune a la vacuna, la dosis necesaria requerida, la vía de administración adecuada y los posibles efectos adversos derivados de su uso. Esto parece indicar que en un futuro no muy lejano será posible diseñar vacunas personalizadas para individuos o grupos poblacionales concretos. Además las nuevas vacunas del futuro serán más seguras, económicas, fáciles conservar y administrar lo que supone una gran ventaja en países en vías de desarrollo. Finalmente, el objetivo es acabar con agentes patógenos emergentes y pandémicos que suponen un reto hoy en día como son el VIH, el virus del Ébola o el virus de la gripe entre otros.

BIBLIOGRAFIA

1. Mota- Sánchez J. Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria . Salud Publica Mex [Internet]. 2009 [Consultado 27 May 2019]; 51(1):463-9. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900012
2. Plotkin S. History of vaccination. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2014 [Consultado 17 May 2019];111(34):12283-7. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400472111>
3. Mohammed S, Bakshi N, Chaudri N, Akhter J, Akhtar M. Cancer vaccines: Past, present, and future. Adv Anat Pathol. 2016; 23(3):180-91.
4. Cayabyab MJ, Macovei L, Campos-neto A, Izzo A, State C. Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2(154):1-16.
5. Kilbourne ED, Murphy JS. Genetic studies of influenza viruses. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid in ovo adaptation of early passage Asian strain isolates by combination with PR8. J Exp Med. 1960;111:387-406.
6. Tamames S. Vacunación antigripal. Efectividad de las vacunas actuales y retos de futuro. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33(7):480-90.
7. García Fernando. Métodos moleculares para el desarrollo de vacunas. Acta pediátr. costarric [Internet]. 1999 [Consultado May 25 2019]; 13(2): 55-59. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00901999000200002&lng=en.
8. Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. J Exp Med. 1969; 129(6):1349–1365
9. Heidelberger M, Macleod CM, Di Lapi MM. The human antibody response to simultaneous injection of six specific polysaccharides of pneumococcus. J Exp Med. 1948; 88(3):369–372
10. Anderson P, Peter G, Johnston RB, Jr., Wetterlow LH, Smith DH. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of Hemophilus influenzae, type b. J Clin Invest. 1972; 51(1): 39–44.
11. Avery OT, Goebel WF. Chemoimmunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: II Immunological Specificity of synthetic sugar-protein antigens. J Exp Med. 1929; 50(4):533–550

12. Schneerson R, Barrera O, Sutton A, Robbins JB. Preparation, characterization, and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med*; 1980; 152(2):361–376
13. Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC. Maintaining protection against invasive bacteria with protein – polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):213-20.
14. Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*.1999; 27(2):61–69.
15. Hilleman MR, McAleer WJ, Buynak EB, McLean AA. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J Infect*.1983; 7(Suppl 1):3–8
16. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 1982; 298(5872):347–350
17. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 [Consultado 13 Feb 2019];23(4):446-57. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864012703358>
18. James E. Crowe. Host Defense Mechanisms Against Viruses. En: Richard A. Polin, David H. Rowitch, editores. *Fetal and Neonatal Physiology*. Fifth edition. Elsevier; 2017. p. 1175-1197.
19. Dolan BP. Quantitating MHC Class I Ligand Production and Presentation Using TCR-Like Antibodies. *Methods Mol Biol*. 2019; 1988: 149-157.
20. Graham BS. Advances in antiviral vaccine development. *Immunol Rev*. 2013;255(1):230-42.
21. Diana L, Martí M, Genin C, Granados-Gonza V, Riffard S. Papel del dominio V1 / V2 de la glucoproteína 120 del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en la inducción de anticuerpos neutralizantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9):523-30.
22. Buynak EB, Hilleman MR. Live attenuated mumps virus vaccine I. Vaccine development. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966; 123:768-775.
23. Enders JF, Katz SL, Milovanovi MV, Holloway A. Studies on an attenuated measles-virus vaccine I. Development and preparation of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *N Engl J Med*. 1960; 263:153-159.
24. Takahashi M, Okuno Y, Otsuka T. Development of a live attenuated varicella vaccine. *Biken J*. 1975; 18:25-33.
25. Henderson DA. Smallpox eradication. *Proc. R. Soc. Lond.B*. 1977; 199(1134):83-97.

26. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH. Safety and efficacy of high-dose Rhesus-human reassortant rotavirus vaccines - report of the national multicenter analysis. *Pediatrics*. 1996; 97:7-13.
27. Maassab HF, DeBorde DC. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine*. 1985; 3:355-371.
28. Stanberry LR, Strugnelli R. Vaccines of the future. *Perspect Vaccinol* [Internet]. 2011;1(1):151-99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.006>
29. Ghendon YZ, Klimov AI, Alexandrova GI, Polezhaev FI. Analysis of genome composition and reactogenicity of recombinants of cold-adapted and virulent virus strains. *J. Gen. Virol.* 1981; 53:215-224.
30. Crawford CR, Faiza AM, Mukhlis FA. Use of zwitterionic detergent for the preparation of an influenza virus vaccine. 1. Preparation and characterization of disrupted virions. *Vaccine* [Internet]. 1984 [Consultado 25 Abr 2019]; 2(3):193-198.
31. Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM₄₅ and CRM₁₉₇. *Nucleic Acid Res.* 1984; 12(10):4063-4069
32. Fernández-Padra M, Rodríguez OD et al. Uso de vacuna frente a hepatitis B adyuvada con AS04C en pacientes VIH. *Rev Esp Quimoter.* 2018; 31(2):105-109. Uso de vacuna frente a hepatitis B adyuvada con AS04C en pacientes VIH. *Rev Esp Quimoter.* 2018; 31(2):105-109.
33. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical Applications of DNA Vaccines : Current Progress. *Vaccines*. 2011;53:296-302.
34. Reyes-Sandoval A, Ertl HC. DNA vaccines. *Curr Mol Med* 2001;1(2): 217-243.
35. Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 2005;7(5-6):932-938
36. Tori S. Estudio molecular con orientación clínica: Virus. 1ª edición. Médica Panamericana; 2009.
37. González-romo F, Picazo JJ. El desarrollo de nuevas vacunas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(8):557-68.
38. Brito LA, Kommareddy S, Maione D, Uematsu Y, Giovani C, Scorza FB, et al. Self-Amplifying mRNA Vaccines. *Adv Genet* [Internet]. 2015;89:1-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2014.10.005>
39. Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines : progress , challenges , applications. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013;4(6):737-49.
40. Kreiter S, Selmi A, Diken M, Koslowski M, Britten CM. Intranodal Vaccination with Naked Antigen-Encoding RNA Elicits Potent Prophylactic and Therapeutic Antitumoral Immunity. *Cancer Res*. 2010;70(22):9031-41.

41. Ulmer JB, Mansoura MK, Geall AJ, Ulmer JB, Mansoura MK, Geall AJ. Vaccines 'on demand': science fiction or a future reality. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(2):101-6.
42. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat biotechnology.* 2012;30(12):1210-6.
43. Kramps T, Elbers K. Introduction to RNA Vaccines. En: Kramps T, Elbers K. editors. *RNA Vaccines. Methods in Molecular Biology.* 978-1-4939-6479-6. New York: Humana Press; 2017.p. 1-11.
44. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2014[Consultado 2 Abr 2019];32(2):106-14. Disponible en: https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0213005X1200434X.pdf?locale=es_ES
45. Garçon N, Leroux-roels G, Cheng W. Vaccine adjuvants. En: *Understanding Modern Vaccines. Perspectives in Vaccinology [Internet].* Elsevier B.V.; 2011. p. 89-113. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.004>
46. Wen Y, Shi Y. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect [Internet].* 2016[Consultado 4 May 2019];5(3):1-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.40>
47. Calabro S, Tritto E, Pezzotti A, Taccone M, Muzzi A, Bertholet S, et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine [Internet].* 2013[Consultado 6 May 2019];31(33):3363-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.007>
48. Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(3):531-9.
49. Cimica V, Galarza JM. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clin Immunol [Internet].* 2017[Consultado 7 Mar 2019];183:99-108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2017.08.004>
50. Fleischmann WR Jr. Viral Genetics. En: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8439/>
51. Sanjua R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral Mutation Rates. *J Virol.* 2010;84(19):9733-48.

52. Mclean KA, Goldin S, Nannei C, Sparrow E, Torelli G. The 2015 global production capacity of seasonal and pandemic influenza vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2016[Consultado 4 Mar 2019];34(45):5410-3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.019>
53. Dunkle LM, Izikson R, Patriarca PA, Goldenthal KL, Cox M, Treanor JJ. Safety and Immunogenicity of a Recombinant Influenza Vaccine: A Randomized Trial. *Pediatrics*. 2018; 141(5): 1-10.
54. Karasavvas N, Billings E, Rao M, Williams C, Zolla-pazner S, Bailer RT, et al. The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine Trial (RV144) Regimen Induces Antibodies That Target Conserved Regions Within the V2 Loop of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(11):1444-57.
55. Haynes BF, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *N Engl J Med*. 2012;366(14):1275-86.
56. Arsuaga-Vicente M, de la Calle-Prieto F, Mora-Rillo M, Arnalich-Fernandez F, Arribas JR. Enfermedad por virus ebola: actualización. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(7):452-60.
57. Avendaño C. Tratamientos experimentales contra el virus Ébola Zaire. *An Real Acad Farm*. 2014;80(4):649-65.
58. Salazar PM de, Suy A, Sánchez-montalvá A, Rodó C, Salvador F, Molina I. Zika fever. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(4):247-52.
59. Kantor IN. Dengue, Zika, Chikungunya Y El Desarrollo De Vacunas. Com Redacción, Med (Buenos Aires) [Internet]. 2018[Consultado 3 May 2019];78:23-8. Disponible en: <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/29360072.pdf>
60. Reina J. Situación actual de las vacunas frente al virus Zika. *Vacunas* [Internet]. 2017[Consultado 5 Mayo 2019];19(1):18-23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vacun.2017.05.004>
61. Abbink P, Stephenson K.E, Barouch H.D. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(10):594–600)
62. Ferreira J, Porco A. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. *INCI* [Internet]. 2008 [citado 2019 Mayo 28]; 33(5):353-358. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000500008&lng=es.
63. Delany I, Rappuoli R, Gregorio E De. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):708-20.
64. Nabel GJ. Designing Tomorrow`s Vaccines. *N Engl J Med*. 2013;368(6):551-60.

65. Soria-guerra RE, Nieto-gomez R, Govea-alonso DO, Rosales-mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction : Implications on vaccine development. *J Biomed Inform* [Internet]. 2015[Consultado 16 May 2019];53:405-14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
66. Poland GA, Kennedy RB, McKinney BA, Ovsyannikova IG, Lambert ND, Jacobson RM, et al. Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: Individualized vaccinology in the 21st century. *Semin Immunol*. 2013; 25(2):89–103.
67. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Smith DI. Heterogeneity in vaccine immune response: The role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82:653–64
68. Beg S, Samad A, Nazish I, Sultana R, Rahman M, Ahmad MZ, et al. Colloidal drug delivery systems in vaccine delivery. *Curr Drug Targets*. 2013;14:123–37
69. Jain H, Kumavat V, Singh T, Versteilen A, Sarnecki M. Immunogenicity and safety of a pediatric dose of a virosomal hepatitis A vaccine in healthy children in India. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(7):2089-97.
70. Rybicki EP. Plant-based vaccines against viruses. *Virol J*. 2014;11(1):1-20.