



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VACUNACIÓN CON ADN

TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:
GALLARDO CELIS JANET



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profa. María del Carmen Cortés Decuir
Vocal	Prof. Saturnino de León Chapa
Secretario	Prof. Raúl Garza Velasco
1er. Suplente	Profa. María del Pilar Granada Macías
2º. Suplente	Prof. Marco Antonio Velasco Velásquez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química UNAM y otras diversas bibliotecas de los sectores académicos y de salud.

Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Asesor

Gallardo Celis Janet

Sustentante



DEDICATORIAS

A mis **padres** por confiar en mí y apoyarme, en especial, a mi **madre** por alentarme a seguir adelante y ser mi principal motivo para superarme.

A mis **hermanos** por ayudarme y soportarme durante todo este tiempo.

A mi **familia** por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mis **amigos** por sus consejos y los gratos recuerdos durante mi estancia en la preparatoria y universidad.

AGRADECIMIENTOS

A mi **asesor** por escucharme, orientarme en la realización de este trabajo y ser un ejemplo a seguir.

A la **UNAM** y la **Facultad de Química** por permitirme estudiar con los mejores profesores e instalaciones.



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
HISTORIA DE LA VACUNACIÓN	6
Edward Jenner y la vacuna contra la viruela	7
Louis Pasteur y las vacunas de microorganismos atenuados	11
Bacilo de Calmette y Guerin (BCG)	14
Características de una vacuna ideal	15
Vacunología inversa	18
Problemas éticos, sociales y económicos de la vacunación	26
TIPOS DE VACUNAS	31
Vacunas constituidas por microorganismos vivos atenuados	31
Vacunas de microorganismos muertos o inactivados	35
Vacunas de subunidades	36
Vacunas con toxinas inactivadas (toxoides)	42
Vacunas anti-idiotipo	44
Vacunas del ADN recombinante	45
VACUNACIÓN CON ADN	47
i. Bases fundamentales de la vacunación con ADN	47
ii. Plásmidos, componentes esenciales de las vacunas de ADN	52
iii. Regulación de los plásmidos utilizados en vacunas de ADN	55
Promotores	56
Motivos CpG	57
Mecanismo de acción de los motivos CpG	59
Motivos neutralizantes	61
Secuencias Kozak	62
Uso de codones	62
Secuencias intensificadoras o potenciadoras	63

Intrones	64
iv. Vectores MIDGE	64
v. Expresión de antígenos múltiples: sistemas multivalentes	65
vi. Manufactura de las vacunas de ADN	67
vii. Vías de administración	72
Músculo esquelético	72
Piel	73
Mucosas	75
viii. Respuesta inmune	78
Respuesta inmune en la vacunación con ADN	81
Reconocimiento antigénico por los CTLs en células somáticas	83
Presentación antigénica a los linfocitos T por parte de las APCs	84
Presentación cruzada (<i>cross priming</i>)	86
Factores que modifican la respuesta inmune en las vacunas de ADN	88
ix. Esquemas de inmunización	89
x. Adyuvantes	90
Adyuvantes genéticos	92
Citocinas	93
Quimiocinas	95
Moléculas coestimuladoras	97
Proteínas de fusión	98
Proteínas de choque térmico (hsp)	99
Exotoxinas	99
Inductores de apoptosis	100
Adyuvantes convencionales	101
Geles de hidróxido de Aluminio	101
Lípido A monofosforilado (MPL)	102
xi. Sistemas de liberación	103
Sistemas de liberación mecánicos	104

Inyección con agujas	104
Inyectores a presión	104
Bombardeo de partículas	106
Sistemas de liberación eléctricos	108
Electroporación	108
Sistemas de liberación química	109
Polímeros biodegradables	110
Poli(etilamina) (PEI)	111
Chitosan	111
Poli(láctico-co-glicólico) (PLG)	111
Liposomas	113
Virosomas	114
Sistemas de liberación con acarreadores bacterianos o virales	114
Bacterias atenuadas	114
Bacterial ghost (“fantasmas” bacterianos)	116
Virus	117
xii. Ventajas de la vacunación con ADN	118
xiii. Desventajas en la vacunación con ADN	120
xiv. Ensayos clínicos	123
xv. Aplicaciones	127
Bacterias	128
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	128
Biodefensa	129
Parásitos	130
Virus	134
HIV	134
Influenza	135
Hepatitis B	136
Otros	136
Alergias tipo I	136
Cáncer	138
CONCLUSIONES	139

ABREVIATURAS

141

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

143

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han representado un gran problema desde el inicio de la humanidad, por lo que siempre se ha trabajado en busca de alguna forma de eliminarlas. Sin embargo, la ansiada meta no se ha logrado alcanzar, debido principalmente a factores tales como la existencia de diversos patógenos, los numerosos reservorios animales, la elevada cantidad de portadores sanos y la creciente multi-resistencia a los antibióticos.

En los inicios de la humanidad, esta clase de padecimientos se atribuían a poderes sobrenaturales o a castigos divinos; de hecho, fue hasta que se aplicó el método científico cuando se empezaron a obtener las explicaciones razonadas que se manejan hoy en día.

Evidentemente, la vacunación está considerada como uno de los grandes éxitos en la historia de la salud pública, ya que sumada al descubrimiento y empleo de los antibióticos ha conducido a la disminución y a la erradicación de algunas enfermedades infecciosas, reduciendo las tasas de morbilidad y mortalidad entre la población.

El concepto de inmunidad también existe desde etapas muy tempranas de la historia, cuando el ser humano observó que inoculando exudados de enfermos a las personas sanas no se reproducía la infección; el concepto evolucionó hasta llegar a la vacunación, tal como se conoce actualmente.

Las vacunas se clasifican con base en las características de sus componentes: microorganismos atenuados o inactivados, e inclusive, subunidades provenientes de ellos. Cabe señalar que, desde su aparición en el siglo XVIII, las vacunas se han asociado a diferentes efectos secundarios, lo que en numerosas ocasiones ha provocado su rechazo por parte de la población; ello ha obligado al surgimiento de nuevas estrategias para desarrollar este tipo de productos, buscando que brinden mayor seguridad pero, sobre todo, que no se generen problemas económicos, éticos y sociales asociados a su empleo en humanos.

Las vacunas razonadas en las que se trabaja hoy en día llevan implícito el uso de herramientas trascendentales tales como la ingeniería genética, la bioinformática, la secuenciación del genoma de los microorganismos patógenos y, en general, la biología celular y molecular, a través de la cual se determinan los factores de virulencia de los agentes causales. Esta clase de enfoques integra lo que se denomina vacunología inversa (*reverse vaccinology*).

Sin lugar a dudas, la vacunación con ADN representa una nueva y prometedora estrategia para la prevención y el tratamiento de diversas afecciones, debido a su potencial para inducir una respuesta inmune humoral y celular en contra del antígeno codificado en el ADN recombinante. Las vacunas del ADN recombinante suelen ser plásmidos constituidos por un origen de replicación, un promotor, diversas secuencias que codifican para la síntesis del antígeno de interés y para sustancias que actúan como adyuvantes. Entre las vías más efectivas para su administración se cuentan la intramuscular y la intradérmica, aunque también se han realizado ensayos con vías tales como la nasal, oral, vaginal, e inclusive, con otros dispositivos de inoculación. Una vez administrado el vector al hospedero, el ADN se introduce a las células, en donde el antígeno se expresa y procesa para ser reconocido por el sistema inmune, tal como ocurriría en una infección natural.

Esta tecnología ha generado una gran expectativa en cuanto a ser usada en la inmunoterapia contra el cáncer y se espera que llegue a representar el método de elección para la próxima generación de vacunas, particularmente eficaces contra infecciones intracelulares, para las cuales actualmente no se cuenta con vacunas efectivas.

Las ventajas de la vacunación con ADN incluyen seguridad, bajo costo y estabilidad, lo que también facilitaría su almacenamiento y distribución. Por su parte, las desventajas consideran el desarrollo de autoinmunidad, tolerancia inmunológica y la eventual integración del plásmido al genoma del hospedero.

Las vacunas de ADN se encuentran bajo análisis para llevar a cabo la prevención de enfermedades tales como SIDA, leishmaniasis, malaria y hepatitis B, entre algunas otras. Hasta ahora, los resultados obtenidos con las vacunas de ADN en modelos preclínicos, justifican plenamente los trabajos realizados para optimizar su eficacia y seguridad en humanos.

OBJETIVOS

- Describir brevemente los aspectos inherentes a la evolución de la vacunación, desde sus inicios hasta la época actual, así como resaltar su importancia para la sociedad y los problemas que impiden su desarrollo.
- Analizar las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de vacunas.
- Subrayar a la vacunación con ADN como una herramienta actual capaz de sustentar la prevención y tratamiento de enfermedades, así como, señalar sus componentes.
- Analizar el tipo de respuesta inmune desencadenada por la vacunación con ADN, mencionar los diversos adyuvantes utilizados para potenciarla y las principales vías de administración.
- Analizar las principales ventajas y desventajas de la vacunación con ADN, incluidos los problemas para su regulación y aplicaciones.

I. HISTORIA DE LA VACUNACIÓN

Desde los inicios de la humanidad se descubrió la existencia de enfermedades que se transmitían de unas personas hacia otras, tales como la viruela o la lepra, las cuales –de hecho– causaron la desaparición de civilizaciones completas. Sin embargo y aún cuando son varias las etapas históricas transcurridas a lo largo de la vacunación, no es posible detallar con exactitud la fecha en la que empezó a utilizarse este método de protección (21, 189).

Durante las epidemias de peste que devastaron Atenas se pudo comprobar que las personas que habían padecido la enfermedad no volvían a presentarla y, consecuentemente, se les encargaba la atención de los enfermos en los brotes posteriores (116).

El término inmunidad proviene del latín *immunitas*, que significa exención o privilegio y, si bien desde la perspectiva histórica significa protección frente a enfermedades infecciosas, una definición más completa alude a “la reacción contra sustancias reconocidas como extrañas, se trate de microorganismos o componentes de los mismos, tales como proteínas y polisacáridos” (1).

Por su parte, la palabra vacuna, la cual condujo a vacunación (inmunización), proviene del latín *vacca* y fue propuesta en 1980 por Pasteur, quien la definió como una “suspensión de microorganismos vivos (generalmente atenuados), inactivados o fracciones de los mismos, que al ser administrados inducen inmunidad y previenen enfermedades infecciosas o sus secuelas” (116,133).

La FDA define técnicamente a una vacuna como “un inmunógeno cuya administración está prevista para estimular al sistema inmune con el propósito de prevenir, mejorar o tratar alguna enfermedad o infección” (4, 24).

Edward Jenner y la vacuna contra la viruela

La viruela era una de las enfermedades más temidas por la humanidad; en China, desde el siglo X se practicaba la variolización, es decir, la inoculación de pequeñas cantidades de pus, de una persona enferma a una persona sana. Esta estrategia no se limitaba a la viruela, ya que también fue utilizada contra la sífilis, sarampión, fiebre amarilla y leishmaniasis mucocutánea, entre algunas otras, aunque implicaba ligeras modificaciones dependiendo del país que la adoptaba (16, 116, 189).

La variolización contaba con grandes inconvenientes, destacando el alto índice de mortalidad asociado al contagio de la enfermedad y su complicada administración. Cuando la esposa del embajador británico en

Estambul –*Lady Mary Wortely Montagu*– conoció el método involucrado, lo introdujo en Inglaterra, después de comprobar su efectividad en criminales y huérfanos, aún en contra de las opiniones de religiosos y filósofos que lo consideraban opuesto a la voluntad divina. Posteriormente, la variolización fue aplicada a los hijos de la princesa de Gales, lo que generó su amplia difusión, pero nunca se estableció como una medida de rutina, debido a las desventajas antes mencionadas. (15, 16, 17, 116)

Quienes señalan a *Edward Jenner*, médico rural inglés, como el descubridor de las bases de la vacunación, basan su afirmación en el hecho de que él se encontró con una técnica eficaz para sustituir a la variolización: al escuchar que las ordeñadoras de vacas que habían contraído la viruela vacuna no enfermaban de viruela humana decidió realizar una indagación más seria. Cabe señalar que la viruela vacuna se presenta en las ubres de las vacas y que las lesiones cutáneas que origina en las personas infectadas resultan muy similares a las lesiones que caracterizan a la viruela humana, aunque sin la gravedad de esta última enfermedad (16, 86, 189).

Después de un largo período de observaciones, el 14 de mayo de 1796 Jenner inoculó al niño *James Phipps* con linfa extraída de una pústula de viruela localizada en el brazo de la ordeñadora *Sara Nelmes*; la inoculación se llevó a cabo practicando dos cortes superficiales en el brazo y el proceso no mostró mayores alteraciones: al séptimo día el niño manifestó fatiga, en el noveno perdió el apetito y presentó un ligero dolor de cabeza,

pero al día siguiente se recuperó completamente. Posteriormente, para comprobar la eficacia de la vacunación, inoculó al mismo niño el virus de la viruela humana, comprobando que los únicos síntomas evidentes correspondían a la aparición de pústulas; al cabo de algunos meses volvió a inocular repetidamente al niño sin encontrar efectos detectables, por lo que concluyó que la inmunidad proporcionada era permanente, aunque los refuerzos eran necesarios, debido principalmente a que la vacuna sólo imita en algún grado la infección (21, 133, 186).

La tabla 1 muestra los años de introducción de las vacunas más relevantes.

Tabla 1. Introducción de algunas vacunas relevantes (86).

Fecha	Enfermedad	Tipo de Vacuna
1721	Viruela	“Variolización” virus vivo
1796	Viruela	Virus de la viruela vacuna
1885	Rabia	Virus atenuado
1896	Cólera	Bacteria inactivada
1896	Tifoidea	Bacteria inactivada
1923	Difteria	Toxoide purificado
1927	Tétanos	Toxoide purificado
1927	Tuberculosis (BCG)	Cepa atenuada
1936	Influenza	Virus inactivado
1955	Polio	Virus inactivado
1984	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B	Polisacárido purificado
1987	Hepatitis B	Recombinante

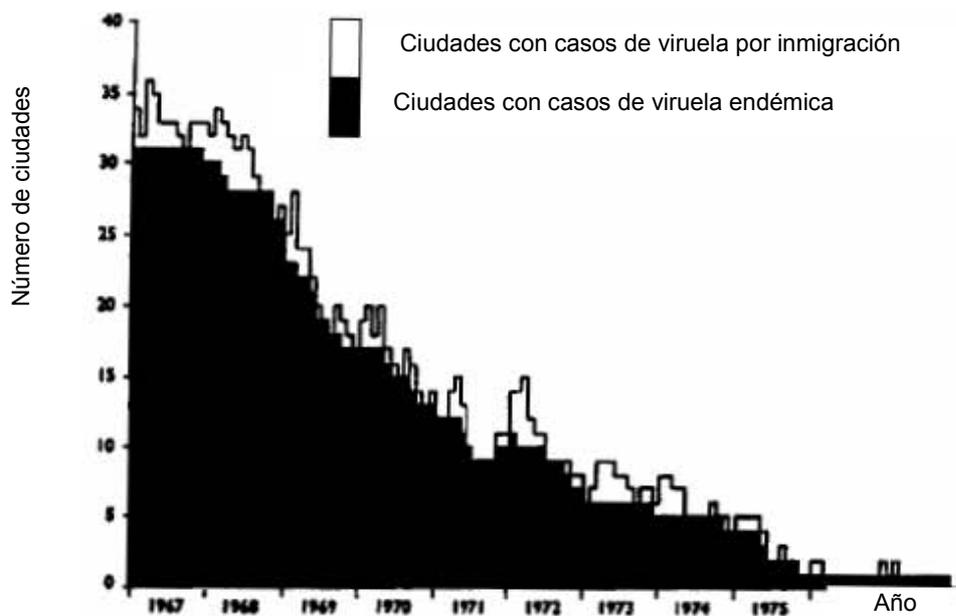
Los resultados obtenidos por Jenner fueron publicados en 1798, en *Variolae Vaccínea* –después de haber sido rechazados por *Transactions of the Royal Medical Society*– y en menos de 10 años la vacunación contra la viruela se extendió a todo el mundo, salvando la vida de millones de personas. Lógicamente, este método demostró el concepto de inmunidad cruzada, es decir, la presencia de los mismos determinantes antigénicos en ambos virus, con lo que es posible brindar inmunidad sin que se corra el riesgo de presentar las consecuencias de la enfermedad (17, 189).

Por otra parte, si bien Jenner no fue el primero en utilizar este procedimiento de inmunización, sí se le reconoce como el primer profesional que utilizó el método científico para observar las ventajas de la vacunación sobre la variolización (21, 133).

Después de haberse llevado a cabo intensas campañas de vacunación contra la viruela y a casi dos siglos de que tuvieron lugar los experimentos de Jenner, en 1979 la OMS declaró que dicha enfermedad era la primera en ser erradicada a nivel mundial (consultar la gráfica 1). Evidentemente, en el éxito de esta vacuna deben considerarse varios factores, destacando las extensas campañas involucradas, la participación de la inmunidad cruzada, la ausencia de reservorios animales y de portadores sanos. Por otra parte, es obvio que resultaría muy infortunado que, después de más de 20 años sin vacunación –lo que determina que la población mundial actual sea susceptible a la viruela– ocurriera algún ataque terrorista que implicara al virus “salvaje”, ya que la enfermedad podría propagarse

ampliamente; a este respecto, es preciso comentar que sólo se conservan algunas cepas en ciertos centros de investigación (4, 23, 133, 144, 151).

Gráfica 1. Número de ciudades con casos de viruela de 1967 a 1978 (151).



Louis Pasteur y las vacunas de microorganismos atenuados

En el siglo XIX diversos científicos contribuyeron al desarrollo de la medicina y la biología, proponiendo la existencia de los microorganismos y estableciendo su relación con diferentes enfermedades infecciosas; a tal respecto, destaca Louis Pasteur, a quien algunos consideran el padre de la bacteriología y que, además, descubrió la posibilidad de modificar

artificialmente la virulencia de los agentes infecciosos para usarlos como fuentes de protección hacia los originales (16, 62, 86).

En 1879, Pasteur cultivó exitosamente al bacilo responsable del cólera aviar (*Pasteurella multocida*) y demostró cómo se podía provocar la enfermedad, al inyectar en aves una suspensión pura del microorganismo en cuestión. Después de varios experimentos, describió que los animales podían resistir a la enfermedad si se les inoculaba al agente causal previamente atenuado; la atenuación resultó posible exponiendo los cultivos a una cierta cantidad de aire durante períodos de tiempo determinados y el científico concluyó: “la posibilidad de hacer a los animales menos susceptibles a la forma virulenta de un microorganismo, es poniéndolos en contacto con la forma atenuada de este último” (16, 25,116).

Pasteur también trabajó con ántrax, una enfermedad de borregos, vacas y otros animales que excepcionalmente infecta al humano; primero cultivó al agente etiológico *Bacillus anthracis*, a una temperatura de 42-43°C por dos semanas, lo que dio como resultado la pérdida de su virulencia. Realizó una demostración pública: inoculó bacilos atenuados a una parte del lote utilizado –constituido por 24 ovejas, 1 cabra y 4 vacas– y, unas semanas después, les administró microorganismos originales de ántrax a todos los animales: los no vacunados murieron, mientras que los inmunizados previamente permanecieron sanos (16, 25, 66, 116,133).

En cuanto a la vacuna contra la rabia, Pasteur utilizó al virus atenuado, obtenido a partir de la médula espinal de los animales infectados; sin embargo, enfrentó dos problemas: el agente causal no puede observarse al microscopio óptico y la enfermedad tiene un amplio periodo de incubación. De cualquier manera, sus ensayos realizados en perros se realizaron con éxito, previa detección de que la mejor vía de administración de la vacuna era la intracerebral, la cual se llevaba a cabo previa trepanación (perforación del cráneo); la virulencia podía ser atenuada exponiendo la médula espinal de conejos infectados al aire seco estéril. El 6 de julio de 1885 inoculó exitosamente la vacuna al niño *Joseph Meister*, lo que estableció que la rabia fuera erradicada de la mayor parte de los animales domésticos y que el ser humano contara con un antídoto contra el padecimiento (16, 21, 25, 116, 151).

Las observaciones realizadas por Pasteur terminaron por destacar la importancia de la respuesta inmune, permitieron entender los principios generales de la vacunación y abrieron la posibilidad de introducir las vacunas inactivadas, lo que representó un incremento en la seguridad de los inmunógenos empleados.

Bacilo de Calmette y Guerin (BCG)

Esta vacuna representa una notable excepción desde el punto de vista de que se emplea para tratar de controlar patógenos intracelulares; en otras palabras, el bacilo de la tuberculosis (TB) es la única bacteria intracelular de gran trascendencia contra la cual existe una vacuna de amplia utilización mundial: la BCG, constituida por microorganismos atenuados y considerada uno de los mayores éxitos de la vacunología, desde su aparición en los inicios del siglo XX. Camille Calmette, físico microbiólogo, y Alphonse Guerin, médico veterinario, trabajaron arduamente en su desarrollo y, en 1906, descubrieron que la especie *Mycobacterium bovis*, agente causal de la TB en bovinos, era estructural e inmunológicamente parecida al complejo *M. tuberculosis* y podía ser cultivada en el laboratorio.

En primer lugar, obtuvieron una cepa atenuada estable, incapaz de causar TB: mediante subcultivos sucesivos (213 veces en 13 años) en un medio enriquecido con bilis de res, transformaban la capacidad patogénica de un bacilo tuberculoso aislado originalmente por Edmond Nocard y después de realizar diversos ensayos, pudieron comprobar su inocuidad (16, 36, 66, 116,151).

En 1921, se llevo a cabo el primer ensayo clínico realizado en humanos, en un hospital de Paris que atendía a los recién nacidos asociados a familias infectadas con TB y que, por lo tanto, estaban sometidos a un alto de riesgo de contagio; la eficacia de la vacuna se demostró al disminuir la mortalidad de los mismos. Por otra parte, uno de los numerosos debates

relacionados con esta vacuna se presentó en Alemania: al enviarse una cepa al Hospital de Lübeck fue contaminada accidentalmente y, al serle aplicada a un grupo de recién nacidos, les ocasionó la muerte o TB crónica. Al observar este problema, Calmette empezó a poner mayor énfasis en la seguridad del cultivo y en la conservación de la cepa. Actualmente, después de haberse superado diversas dificultades, la vacuna BCG es considerada como una de las vacunas empleadas más ampliamente aunque, con la secuenciación del genoma del complejo *M. tuberculosis*, se espera que se realicen modificaciones que generen una mayor eficacia al producto vacunal (21, 36, 116).

Características de una vacuna ideal

Las vacunas preparan al sistema inmune para su oportuna y vasta respuesta cuando ingrese algún microorganismo o sus toxinas; desde el punto de vista inmunológico, una vacuna ideal es aquella que imita a la infección y/o a la intoxicación natural, generando una respuesta inmune específica, eficiente, humoral y celular, la cual sea de largo plazo y sin la necesidad de acompañarla con adyuvantes (167).

Adicionalmente, debe considerar las características de obtención y preparación del antígeno, ya sea mediante cultivos en el laboratorio, síntesis química o biología molecular pero, al margen de ello, ese antígeno debe corresponder a un buen inmunógeno, capaz de inducir una respuesta inmune de memoria dependiente de linfocitos T. En general, los antígenos se pueden dividir entre los que desencadenan respuestas dependientes de linfocitos T (TD) e independientes de linfocitos T (TI) (1, 15, 115).

Los antígenos TD son en su mayoría proteínas que inducen la formación de anticuerpos por los linfocitos B (previa interacción de éstos con los linfocitos T), dando lugar a una respuesta inmune duradera, humoral y celular; son buenos inmunógenos, aún en menores de 2 años y dejan memoria inmunológica (115).

Por su parte, los antígenos TI suelen corresponder a moléculas de alto peso molecular y con subunidades repetitivas, las cuales no originan una respuesta inmune con memoria, ni requieren de los linfocitos T cooperadores para estimular la respuesta inmune; frecuentemente se trata de polisacáridos, además, se les puede clasificar en dos grandes grupos, dependiendo de su interacción con los linfocitos B: antígenos TI-1 y TI-2. Los antígenos TI-1, tales como los lipopolisacáridos (LPS), son potentes mitógenos de los linfocitos B; mientras tanto, los TI-2 consisten en estructuras altamente repetitivas, como los polisacáridos bacterianos, que sólo activan linfocitos B maduros. En general, resultan inmunógenos

débiles en menores de 2 años, no dejan memoria inmunológica y se pueden transformar en TD al ser conjugados con proteínas (15, 115, 116).

Los esquemas de vacunación contemplan la posibilidad de aportar suficiente cantidad de antígeno al sistema inmune y a sus diferentes poblaciones, para que se genere una cantidad vasta de linfocitos T y B; por obvio, pretenden proveer protección temprana, por lo que numerosos productos vacunales son administrados durante la infancia, aún cuando el sistema inmune no ha madurado completamente (167).

Por lo que respecta a otras características, las vacunas ideales deben ser estables y seguras, no requerir de refrigeración durante su almacenamiento y distribución, presentar los mínimos efectos adversos, desencadenar una vasta respuesta con una dosis mínima de antígeno, fácil de administrarse y ser polivalentes, es decir, actuar ante la presencia de varios microorganismos. Además, deben resultar económicamente accesibles para permitir la implementación de campañas de vacunación hasta en los países en vías de desarrollo, en los cuales siguen muriendo miles de personas por enfermedades que bien pueden ser prevenidas. La tabla 2 resume algunas características de una vacuna ideal (7, 74, 167).

Es importante aclarar que la cadena o red de frío es el sistema que permite mantener y conservar las vacunas dentro de ciertos rangos de temperatura, a fin de garantizar su inmunogenicidad, manejo, transporte y

distribución, a partir de su salida del laboratorio y hasta el lugar en donde serán aplicadas (179).

Tabla 2. Factores necesarios para considerar a una vacuna como exitosa (167).

Factor	Requisito
Eficacia	Inducir altos niveles de inmunidad con una duración adecuada.
Disponibilidad	El antígeno debe ser fácil de cultivar en grandes volúmenes.
Estabilidad	Permanecer estable bajo condiciones climáticas extremas.
Bajo costo	Para implementar fuertes campañas de vacunación.
Seguridad	Carecer de patogenicidad.

Vacunología inversa

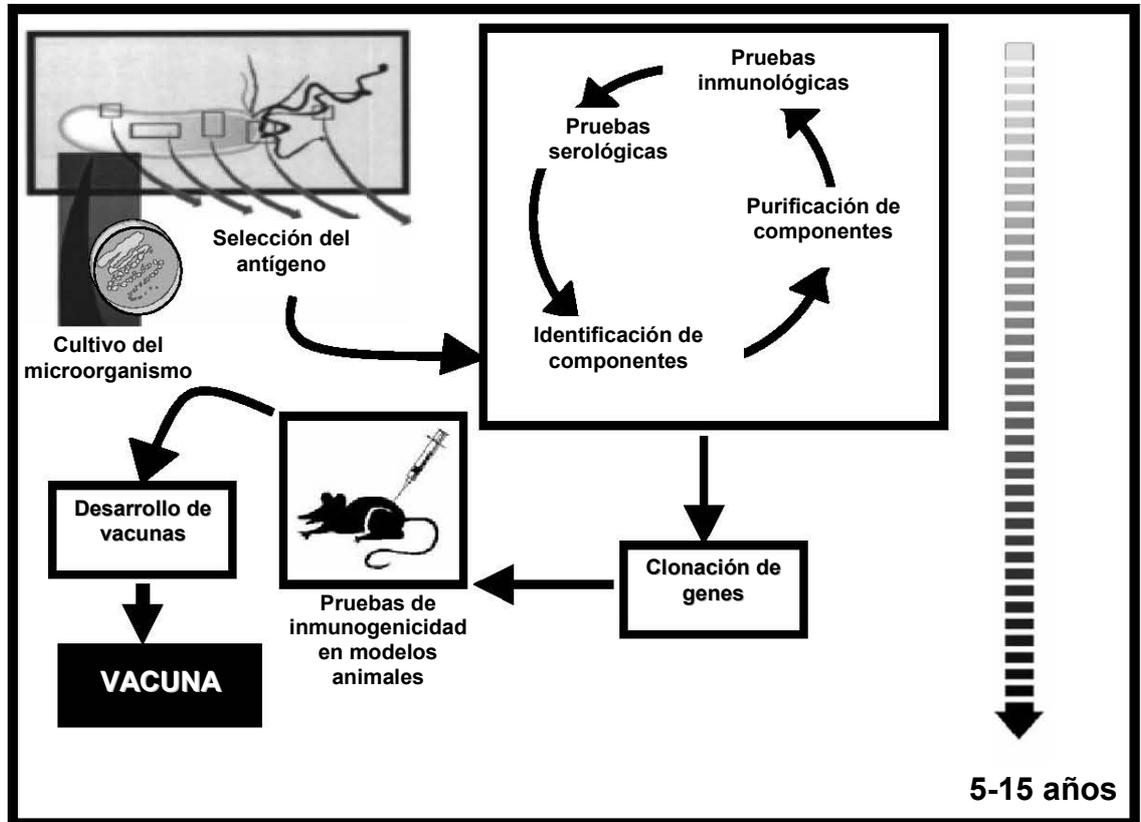
El desarrollo de vacunas ha mostrado un notable progreso desde que Jenner y Pasteur comenzaron con las primeras investigaciones; aún cuando en la actualidad existen numerosos patógenos que afectan la salud pública en todo el mundo, también se deben considerar los recientes avances en los campos de la biología molecular, biotecnología y bioinformática, así como, los interesantes conocimientos sobre la relación hospedero-patógeno y el funcionamiento de la respuesta inmune, ya que ello ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas para el diseño

racional de las vacunas, incluidos los microorganismos recombinantes, vectores bacterianos o virales, péptidos sintéticos y polisacáridos (2, 71, 108, 135,159).

La metodología convencional para el desarrollo de vacunas se basa generalmente en la atenuación de los agentes causales mediante cultivos seriados o, más recientemente, a través de la identificación de las determinantes antigénicas de superficie para el desarrollo de vacunas de subunidades; en ambos casos se requiere el conocimiento de los factores de virulencia y la caracterización de la respuesta inmune. Con relación al procedimiento, el microorganismo debe ser cultivado bajo diversas condiciones de laboratorio y, posteriormente, identificar sus componentes antigénicos, los cuales son extraídos y purificados, antes de demostrarse su capacidad para inducir la respuesta inmune. Lo anterior se ejemplifica en la figura 1 (135, 160, 175).

Esta metodología requiere de tiempos relativamente prolongados y las cantidades purificadas del antígeno deben ser suficientes para realizar las pruebas correspondientes. Por otra parte, aunque se llegara a demostrar una alta eficacia en la inducción de la respuesta inmune en el laboratorio, ello no aseguraría buenos resultados dentro del hospedero, por lo que el proceso global es tan lento, que habitualmente tarda décadas en aportar los resultados positivos que se buscan; además, todo se complica ostensiblemente cuando el microorganismo involucrado es un parásito obligado que no puede ser cultivado en el laboratorio (159).

Figura 1. Método convencional asociado al desarrollo de vacunas (2).

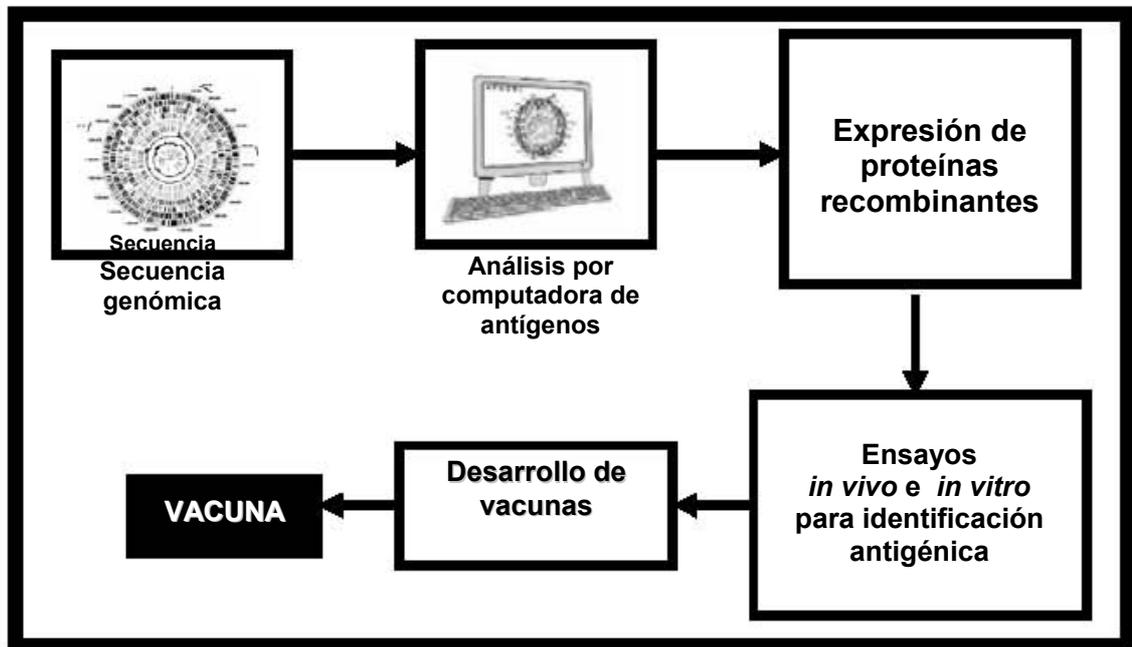


La posibilidad de determinar la secuencia genómica de una bacteria en poco tiempo, así como los notables avances en inmunología y bioinformática, han revolucionado enormemente el campo de la vacunología, ya que actualmente se pueden identificar numerosos antígenos potenciales para el desarrollo de vacunas, sin la necesidad de que el agente causal sea cultivado en el laboratorio. La metodología anterior se ha denominado “vacunología inversa” (*reverse vaccinology*) y sus pasos más importantes se ilustran en la figura 2. La bioinformática representa una herramienta muy útil, la cual ha evolucionado rápidamente,

al aplicarse en la interfase entre la biología y el almacenamiento de bases de datos, algoritmos computacionales y análisis de datos. De esta manera se ha logrado reconocer proteínas antigénicas y, con ello, disminuir tiempo y costos, encontrándose soluciones para enfermedades en la cuales la metodología convencional había fallado (116, 165, 171, 175).

La secuencia genómica de *Haemophilus influenzae* publicada en 1995, permitió descubrir antígenos potenciales para el desarrollo de una vacuna. Recientemente, la secuenciación del genoma de *Plasmodium falciparum* y de su vector, *Anopheles gambiae*, ha abierto nuevas esperanzas para obtener una vacuna efectiva contra el paludismo y, en la actualidad, se cuenta con alrededor de 172 secuencias genómicas completas de microorganismos patógenos y más de 400 se encuentran en vías de ser secuenciadas. Por obvio, toda esta información genética podrá ser utilizada para analizar proteínas microbianas significativas, comparar las secuencias genómicas entre bacterias patógenas y comensales y, desde luego, identificar los genes relacionados con diversas enfermedades (76, 116, 135, 171, 175).

Figura 2. Vacunología inversa (2).



La virulencia de un microorganismo puede definirse como su capacidad para producir enfermedad y/o muerte en hospederos susceptibles, lo que implica una actividad coordinada de varios genes. La capacidad de las bacterias patógenas para adherirse a los tejidos y colonizarlos resulta esencial para iniciar la infección y desarrollar la enfermedad; estas moléculas de adhesión, así como numerosas proteínas extracelulares (más accesibles a los anticuerpos que las proteínas intracelulares), representan factores de virulencia candidatos para el desarrollo de vacunas previo estudio en modelos experimentales *in vivo*. Sin embargo, actualmente existen numerosos algoritmos computacionales que permiten identificar proteínas provenientes de secuencias genómicas de un banco de datos; a este respecto, es claro que aunque no todas las moléculas proteicas implicadas son extracelulares, ni se sitúan en la superficie de las células microbianas, su existencia significa un avance importante (76, 135).

De acuerdo con lo antes señalado, el éxito de la tecnología genómica en el desarrollo de vacunas depende en gran medida del criterio de selección de antígenos; éste se realiza mediante el análisis *in silico*, el cual consiste de varios pasos: en primer lugar, se predicen productos proteicos vía un análisis de segmentos de ADN con regiones codificadoras, usando bases de datos y programas de computación; en segundo lugar, se predicen las fases de lectura abierta (ORF), las cuales contienen la información necesaria para llevar a cabo la transcripción del ARN y se emplean para identificar los segmentos de ADN con regiones codificadoras. El tercer paso consiste en la identificación de la localización celular de las proteínas; las bases de datos son usadas para predecir las características asociadas a la superficie bacteriana, tales como proteínas extracelulares, aminoácidos aromáticos en el C-terminal de la proteína o motivos Leu(Ala/Val)-Leu-Ala(Ser)-Gly(Ala)-Cys en el N-terminal de las lipoproteínas (111, 116, 135).

El análisis *in silico* da como resultado la selección de un gran número de genes, cubriéndose más del 25% del número total de ORFs en el genoma; el uso de la robótica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite su clonación y expresión. Posteriormente, se analizan las proteínas; dependiendo de su localización, la purificación de las proteínas recombinantes se realiza por cromatografía de afinidad, lo que se complementa llevando a cabo la inmunización correspondiente en ratas para observar la capacidad para inducir la respuesta inmune. La

vacunología inversa identifica nuevos antígenos que no se pueden reconocer mediante metodologías convencionales y ha sido utilizada exitosamente en patógenos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. La tabla 2 muestra una comparación entre la metodología convencional y la genómica en el desarrollo de vacunas (111, 116, 135).

Tabla 2. Metodologías convencional y genómica en el desarrollo de vacunas (159).

Metodología Convencional	Vacunología inversa
El microorganismo debe ser cultivado en el laboratorio.	El microorganismo puede ser cultivado en el laboratorio o no.
Los antígenos son expresados <i>in vitro</i> .	Los antígenos pueden ser expresados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
Los modelos animales son indispensables.	Los modelos animales son indispensables.
La vacuna se constituye de componentes estructurales de los microorganismos.	La vacuna se puede constituir de componentes no estructurales de los microorganismos, incluyendo proteínas de virus.
Los polisacáridos pueden ser utilizados como antígenos.	Los antígenos de naturaleza no proteica, no pueden ser utilizados como vacunas.
	Pueden identificarse inmunógenos débiles.

Un ejemplo relativo a la aplicación exitosa de la vacunología inversa incide en el desarrollo de la vacuna contra *Neisseria meningitidis* serotipo B (MenB), bacteria capsular Gram-negativa. En 1960, las vacunas consistían de polisacáridos purificados, contra los serotipos A, C, Y y W135, las cuales resultaban altamente efectivas en adultos. Posteriormente, los polisacáridos fueron unidos a proteínas acarreadoras y generaron una vacuna contra el serotipo C, efectiva en niños y recién nacidos. Sin embargo, no existía una vacuna contra el serotipo B, agente causal del 32 al 80% de las enfermedades meningocócicas, ya que los polisacáridos capsulares correspondientes son de una composición química idéntica a otros presentes en ciertos tejidos humanos. Ese problema radicaba en la identificación de antígenos, pero empezó a resolverse cuando se determinó la secuencia genómica completa de la cepa virulenta MC58 del MenB (2,152 genes): mediante un análisis por computadora se identificaron los genes que codifican para 650 proteínas de superficie, de las cuales el 50% fueron expresadas y purificadas en *Escherichia coli*. Todas las proteínas fueron utilizadas para inmunizar ratones y, con ello, comprobar su actividad bactericida y determinar su localización celular, dando como resultado 25 proteínas de superficie, las cuales lograron inducir anticuerpos específicos contra la bacteria y, obviamente, sentaron las bases para el desarrollo de una vacuna (77, 83, 135, 159, 160).

Problemas éticos, sociales y económicos de la vacunación

Sin lugar a dudas, la vacunación ha tenido un gran impacto dentro de la sociedad, ya que ha disminuido muy notablemente la frecuencia de diversas enfermedades infecciosas. No obstante, en cierto modo podría afirmarse que las vacunas tienen un gran competidor dentro de la industria farmacéutica en lo referente a la producción de antibióticos, la cual resulta una opción más viable desde el punto de vista económico, aunque implica un serio riesgo consistente en el incremento de la resistencia en los microorganismos. Ello se acrecienta en los países subdesarrollados cuyos pobladores padecen más las diversas enfermedades infecciosas (116, 144).

Cabe señalar que las vacunas pediátricas han prevenido cerca de 3 millones de muertes en todo el mundo, protegiendo a más de 750,000 niños, lo que obliga a que los requisitos para su fabricación incluyan un riguroso control de calidad que garantice su seguridad y eficacia; ésto incrementa los costos de producción, lo cual sumado a los costos de investigación y a las fases clínicas de desarrollo de una vacuna representa un gran problema en la innovación, reduciendo faltas en el suministro y, en algunos casos, hasta cambios en los esquemas de vacunación (144).

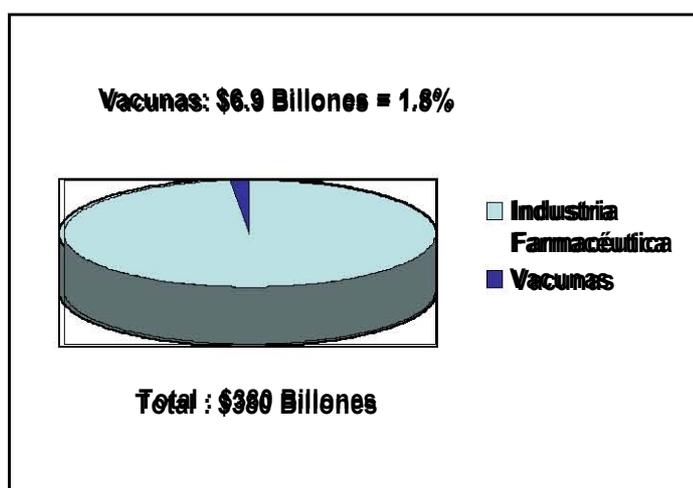
En las vacunas, los problemas asociados a seguridad han ocurrido desde la aparición de los primeros productos y en la actualidad continúan significándose como un reto insoluble, al margen de que ningún producto

alcanza el 100% de efectividad; en tal sentido, la población no está exenta de los efectos adversos implicados, entre ellos, fiebre, malestar general y dolor de cabeza y, desde luego, los individuos inmunocomprometidos son los más susceptibles. Adicionalmente, existen los errores de tipo operativo tales como: contaminación de la vacuna, aplicación inadecuada de la inyección, problemas en la cadena de frío y errores en la dosificación, dilución o administración del inmunógeno, lo que obliga a buscar nuevas estrategias en el desarrollo de las vacunas (4, 23, 40, 186).

Desafortunadamente, los beneficios que las vacunas brindaron durante siglos frecuentemente fueron minimizados, debido a aspectos tales como los antes mencionados. Un problema actual consiste en la presencia de *timerosal* en vacunas pediátricas: diversas publicaciones señalaron que dicho conservador derivado del mercurio podía presentar efectos potenciales en el desarrollo neurológico; sin embargo, un estudio muy completo confirmó que el *timerosal* era eliminado rápidamente y que las concentraciones que alcanzaba en la sangre estaban por debajo de los niveles asociados a efectos tóxicos. No obstante esto último, ocasionó que todas las vacunas que contenían este compuesto fueran consideradas como poco seguras y, consecuentemente, se presentaron faltantes en el suministro afectando a varios niños. Los riesgos de la falta de vacunación no se pueden percibir inmediatamente pero resultan mayores, por lo que un gran desafío reside en lograr que la comunidad acepte “daños menores” relativos a los efectos adversos (56, 144, 198).

Por otra parte, las empresas farmacéuticas prácticamente han abandonado la producción de nuevas vacunas, debido a los pocos ingresos monetarios que genera esta clase de productos, en comparación con otros medicamentos. Por ejemplo, la vacuna pediátrica conjugada contra el neumococo genera ingresos por un billón de dólares anuales, mientras que los medicamentos para el tratamiento de enfermedades cardíacas o los que disminuyen los niveles del colesterol llegan a reeditar cerca de siete billones de dólares anuales cada uno. La gráfica 2 muestra un panorama general del lugar que ocupa la producción de vacunas en la industria farmacéutica (116, 145).

Gráfica 2. Producción de vacunas durante el año 2001 en la industria farmacéutica (116).



Otro factor que perjudica la producción de vacunas consiste en los problemas de regulación, si bien es incuestionable que la normatividad resulta indispensable para garantizar la seguridad del producto. En este

contexto, el costo del desarrollo y de la producción de vacunas es más elevado de lo que se deseara, debido a que se requieren estándares de calidad muy altos; por ejemplo, el costo de las pruebas realizadas a una vacuna contra el rotavirus oscila alrededor de los cuatrocientos millones de dólares, ya que el ensayo implica a 140,000 niños para obtener el prerregistro de venta (75, 116, 145).

Cabe señalar que después de obtenerse el registro de venta de la vacuna también se pueden presentar diversos problemas. En 1974, un investigador aseguraba que la vacuna contra la tosferina había causado un daño cerebral permanente a 22 niños, lo que provocó demandas por parte de las familias perjudicadas. Durante el juicio, se argumentó que la vacuna producía epilepsia, retraso mental, desórdenes en el aprendizaje, coma y algunos otros trastornos, sin que se presentara evidencia científica, por parte de quienes acusaban. Para 1987, se habían llevado a cabo cerca de 800 juicios, con veintiún millones de dólares en pérdidas para las industrias farmacéuticas que producían la vacuna. Posteriormente, se demostró que la vacuna no causa ninguna alteración de aquella índole, pero las empresas ya habían desaparecido (4, 116).

Recientemente, se han creado nuevos programas que defienden a las industrias farmacéuticas de las demandas que carecen de sustento científico, lo que apoyará a organizaciones tales como GAVI (Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización) y el Fondo para Vacunas, las cuales se sumarán a los recursos financieros provenientes de la ONU y la

UNESCO, que buscan contribuir a la erradicación de otras enfermedades infecciosas mediante el desarrollo e innovación en vacunas (4, 102, 144).

Por último, uno de los problemas éticos de la actualidad consiste en la realización de ensayos clínicos en seres humanos: si bien estos procedimientos podrían justificarse, deberían realizarse con base en protocolos más rigurosos. La vacunación ha generado muchas dificultades, pero se ha aprendido de los errores y es preciso continuar educando a las personas, subrayando que representa un método que ofrece grandes beneficios, aunque su aplicación involucre algunos riesgos (4).

II. TIPOS DE VACUNAS

Las vacunas se pueden clasificar con base en las características de sus componentes inmunogénicos: el término vacunas “clásicas” o “convencionales” se aplica generalmente a las constituidas por microorganismos vivos (por lo regular atenuados) o inactivados, ya que en la actualidad existen las confeccionadas por subunidades del microorganismo y las fabricadas mediante ingeniería genética, a las últimas de las cuales se les denomina “vacunas de la tercera generación”; la tabla 3 incluye algunos ejemplos de las mismas (5, 159).

Vacunas constituidas por microorganismos vivos atenuados

Este tipo de vacunas induce inmunidad imitando el proceso infeccioso ocasionado por el patógeno; de hecho, los antígenos son presentados en su forma original, usándose formas atenuadas de los microorganismos, lo que genera una respuesta inmune humoral y celular. Es decir, el microorganismo puede replicarse por sí mismo e infectar otras células, lo cual le permite fungir como inmunógeno sin ocasionar la enfermedad (5, 9, 124).

Sin embargo, es importante considerar que una atenuación excesiva podría limitar la replicación, modificando la magnitud de la respuesta

inmune, haciéndola inadecuada para proporcionar protección contra el microorganismo “salvaje” (124).

Tabla 3. Composición de algunas vacunas de interés (151).

Microorganismos vivos atenuados	Microorganismos muertos completos	Proteínas purificadas o polisacáridos	Ingeniería Genética
Siglo XVIII Viruela Siglo XIX Rabia Inicio del siglo XX BCG Fiebre amarilla Después de la Segunda Guerra Mundial Polio (OPV)* Sarampión Rubéola Adenovirus Varicella Rotavirus	 Tifoidea Cólera Pertusis Influenza Rickettsia Polio (IPV)** Rabia Hepatitis A Cólera	 Difteria Tétanos Neumococo Meningococo Hepatitis B Pertusis Influenza	 Hepatitis B Cólera toxina B Pertussis

* OPV Vacuna de la Polio, vía de administración oral

** IPV Vacuna de la Polio, vía de administración intravenosa

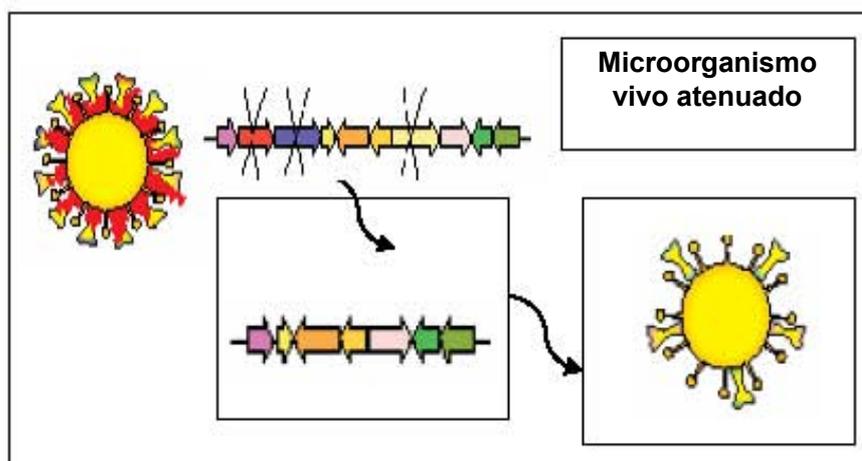
La atenuación corresponde a la parcial o total eliminación de los factores que provocan la enfermedad. En tal sentido, la mutación de un solo nucleótido en un importante gen de virulencia puede concretar la atenuación completa del agente; aquella se obtenía en un principio por

métodos químicos o mediante sustancias mutagénicas y la secuencial selección natural de las cepas mutantes. Otro procedimiento consistía en el cultivo y la propagación de los microorganismos bajo condiciones adversas, a fin de que ocurriera la mutación que modificara la virulencia de la cepa pero no su inmunogenicidad. La figura 3 esquematiza el procedimiento. Este tipo de métodos se realizaba en forma empírica, pero generalmente se seleccionaban las cepas que habían sufrido modificaciones en el genotipo, las cuales anulaban la patogenicidad; sin embargo, el peligro potencial en algunos microorganismos reside en que pueden revertir la mutación, lo que estaría afectando drásticamente la seguridad de la vacuna, sin duda un gran inconveniente para su empleo en personas inmunocomprometidas (38, 109, 126, 151).

Desde el punto de vista inmunológico, este tipo de productos se pueden considerar vacunas ideales, debido a que proporcionan una inmunidad intensa, duradera, humoral y celular, sin la necesidad de refuerzos, en virtud de su elevada inmunogenicidad; además, no requieren administrarse junto con adyuvantes. En cuanto a sus desventajas destaca que para producir la vacuna, el microorganismo debe ser –inevitablemente– cultivado en el laboratorio, aumentando su posible contenido en contaminantes virales, así como, el costo de almacenamiento y conservación, ya que les es necesaria la cadena de frío, para garantizar la viabilidad y eficacia vacunal (9, 124).

Los métodos clásicos de atenuación son por lo regular difíciles de controlar o predecir; no obstante, se espera que el conocimiento de la caracterización genética del agente, sentará las bases para una atenuación exitosa. Actualmente, están bajo investigación mejores estrategias para atenuar a los agentes etiológicos, para lo cual es necesario conocer los componentes microbianos, encontrar los genes que codifican para los factores de virulencia e inducir mutaciones múltiples o deleciones del gen de interés, dependiendo de la especie. En otras palabras, es muy probable el desarrollo de vacunas más seguras en el futuro cercano, en comparación con las elaboradas por metodologías convencionales, ya que la reversión de la virulencia resulta casi imposible. Por ejemplo, la vacuna contra la fiebre tifoidea se obtuvo bajo este concepto, al evidenciarse que la eliminación del antígeno bacteriano O (localizado en la superficie del lipopolisacárido) provocaba la atenuación de *Salmonella typhimurium* comprobable en un modelo murino (9, 118, 124, 164).

Figura 3. Vacuna de microorganismos atenuados (124).



Vacunas de microorganismos muertos o inactivados

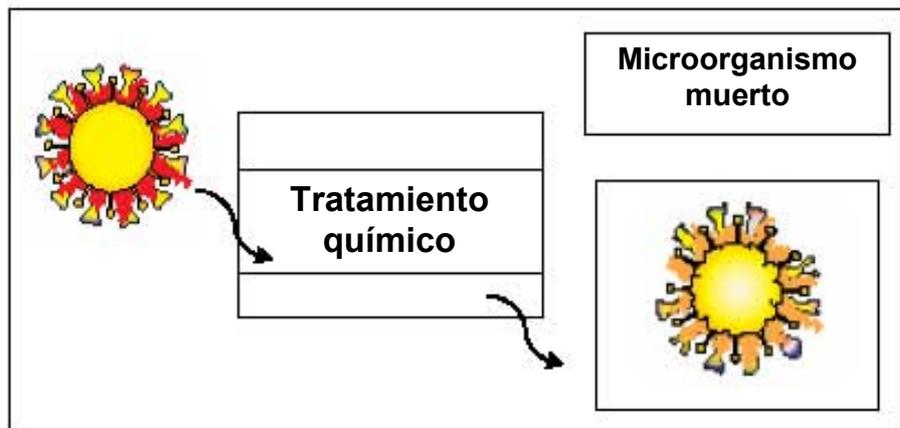
Este tipo de vacunas utiliza al microorganismo completo inactivado (bacteria, parásito o virus) para inducir protección inmunológica. El proceso de inactivación se realiza mediante tratamientos físicos (calor) o químicos (formaldehído), por lo que el microorganismo no se puede reproducir o replicar dentro del hospedero, lo que representa una ventaja, ya que no se presenta el problema de reversión de la virulencia. Evidentemente, dichos procedimientos no alteran la inmunogenicidad de las determinantes antigénicas del microorganismo, lo cual resulta de vital importancia para estimular la respuesta inmune, tal como lo subraya la figura 4; no obstante, se debe cuidar la elección del agente inactivante, ya que una degradación excesiva podría comprometer la protección contra la enfermedad (9, 38, 124).

El problema con este tipo de vacunas radica principalmente en su eficacia, ya que la inmunidad producida es menos intensa y duradera; de hecho, se necesitan grandes cantidades de antígeno para estimular apropiadamente al sistema inmunológico, lo que representa una desventaja desde el punto de vista económico. Además, el incremento de la dosis antigénica puede ocasionar efectos adversos, tales como los debidos a las endotoxinas presentes en las bacterias Gram negativas (38, 124, 164).

Únicamente las vacunas de esta clase contra la tifoidea y la tosferina han seguido en uso. Es importante mencionar que la vacuna contra la polio

compuesta por una mezcla de virus atenuados (más efectivos pero menos seguros) e inactivados (menos efectivos pero plenamente seguros), representa un proyecto muy interesante y se podría estar aplicando en el futuro. De cualquier manera, las vacunas inactivadas suelen inducir una respuesta inmune humoral y no de linfocitos T citotóxicos (CTLs), la última de las cuales se requiere para neutralizar las infecciones intracelulares. Adicionalmente, los refuerzos y la presencia de adyuvantes les es obligada para desencadenar una respuesta inmune adecuada (38, 124).

Figura 4. Vacunas de microorganismos inactivados (124).



Vacunas de subunidades

Un parásito o bacteria suele contener varias determinantes antigénicas (epitopos) que no participan en la respuesta inmune, e inclusive, algunas de ellas podrían suprimir dicha respuesta, mediante la presencia de

inhibidores de la inmunidad o tal vez ocasionar problemas de hipersensibilidad al ser administradas como parte de la vacuna correspondiente (1, 5).

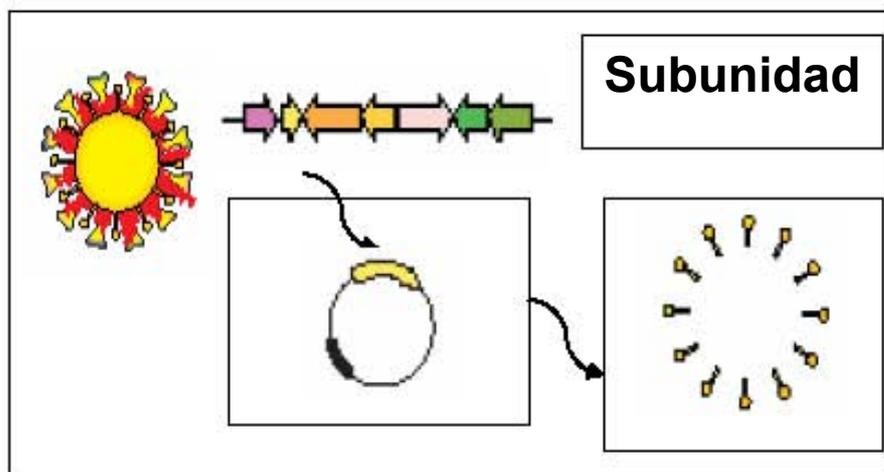
Por tales motivos, durante 70s y los 80s se introdujeron vacunas constituidas por proteínas purificadas o polisacáridos capsulares, a las que se les denominó “vacunas de subunidades” por estar conformadas con una parte de los microorganismos o de las sustancias excretadas por ellos, tal como lo ilustra la figura 5 (5, 38, 152).

Las vacunas de subunidades incluyen polisacáridos, proteínas o péptidos, los cuales son preparados frecuentemente mediante la tecnología del ADN recombinante o vía síntesis química. Los epitopos reconocidos por sus anticuerpos homólogos están restringidos a ciertas zonas de las proteínas o los carbohidratos presentes en la superficie del agente causal (5, 38, 152).

En este aspecto, la cápsula de ciertas bacterias corresponde a uno de los factores de virulencia más importante, ya que protege a la célula bacteriana de la fagocitosis; sin embargo, dado que está compuesta por unidades químicas repetidas –las cuales son diferentes para cada especie– y que cada monómero consta de una combinación de monosacáridos, grupos fosfato y pequeñas moléculas orgánicas, es frecuente que dicho material no resulte un buen inmunógeno (119).

En otras palabras, las vacunas “capsulares” contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), 5 serotipos de meningococos y más de 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* han sido un verdadero éxito, aunque son parcialmente efectivas en niños menores de 2 años y no pueden inducir la activación de los linfocitos B de memoria (152, 164, 167).

Figura 5. Vacunas de subunidades (124).



La baja inmunogenicidad de los polisacáridos se ha venido mejorando cuando se unen estas moléculas a proteínas transportadoras –mediante enlaces covalentes–. A los productos obtenidos se les ha llamado “vacunas conjugadas” y, tal como se observa en la figura 6, dicha unión convierte al polisacárido en un antígeno TD, lo que lo capacita para generar una inmunidad celular con linfocitos T de memoria, así como una persistente repuesta humoral (115, 116, 152, 164).

Ciertamente, la introducción de los antibióticos terminó por detener el desarrollo de este tipo de vacunas, pero las fallas terapéuticas y el surgimiento de las cepas resistentes han vuelto a interesar a los expertos en ellas y en su importante papel profiláctico (151).

Algunos de los principales problemas de las vacunas conjugadas residen en la selección de la proteína acarreadora, la cual puede afectar la respuesta inmune, la frecuencia de la inmunización, la dosis y los costos globales del producto. Diversas proteínas, incluidas el *pili* bacteriano, las proteínas de membrana externa y los toxoides, pueden ser utilizadas para llevar a cabo el proceso de conjugación; no obstante, las propiedades físicas y químicas de las toxinas pueden modificarse sustancialmente y afectar el proceso (115,116, 164).

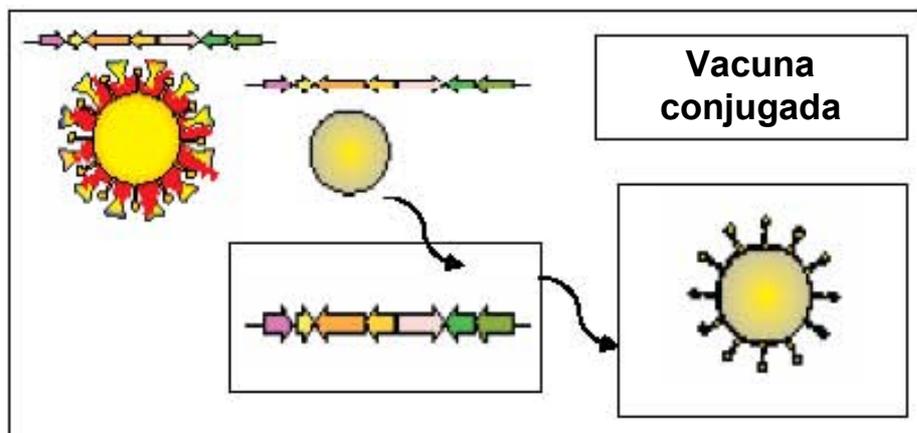
Las proteínas derivadas de las toxinas del tétanos y la difteria han resultado acarreadoras exitosas en animales y humanos, aunque pueden desencadenar problemas de hipersensibilidad, supresión de la respuesta inmune o la aparición de anticuerpos en su contra (115).

Si bien existen numerosas técnicas para realizar la conjugación de moléculas bio-orgánicas que incluyen carbohidratos y proteínas, debe cuidarse que no ocurra la desnaturalización proteica o la hidrólisis del carbohidrato, poniendo especial énfasis en los diversos parámetros de reacción tales como el pH, temperatura, tiempo y reactivos químicos. Por

otra parte, la desconjugación durante el almacenamiento podría provocar una disminución en la inmunogenicidad (116).

Algunos ejemplos de vacunas conjugadas, son: la meningocócica (*Neisseria meningitidis*), la neumocócica (*Streptococcus pneumoniae*) y la primera generación de vacunas frente al *Haemophilus influenzae* tipo b (32, 53, 69).

Figura 6. Vacunas conjugadas (124).



Las técnicas del ADN recombinante, la clonación y la secuenciación han permitido determinar la exacta secuencia de aminoácidos en diferentes antígenos y, actualmente, se están sintetizando péptidos, que al ser utilizados como vacunas ofrecen grandes ventajas en términos de pureza, costo de producción, almacenamiento, estabilidad y alta especificidad, al margen de que resultan muy efectivos en cuanto a la etapa de presentación vía los MHC de las clases I y II (164).

Sin embargo, algunos son menos eficientes en cuanto a la estimulación de la respuesta humoral, problema que se está intentando combatir con la incorporación de proteínas acarreadoras y el uso de adyuvantes. Además, dado lo pequeño de su tamaño, podrían insertarse fácilmente en otras proteínas virales, sin modificar su estructura (38, 74, 118).

Otra de sus desventajas consiste en la dificultad para simular la conformación antigénica original, encontrada en numerosos patógenos, debido a que la estructura tridimensional de las proteínas es la responsable de su actividad biológica y, desde luego, antigénica (114).

Las vías de administración que han resultado efectivas en la aplicación de esta clase de vacunas, son: la intranasal, oral y la liberación intradérmica. Con respecto a las perspectivas para su manufactura, es claro que ofrecen la posibilidad de pasar del campo experimental al farmacéutico, pues realizar cultivos a gran escala es poco práctico, cuando se le compara con el desarrollo de péptidos sintéticos (9, 164).

En general, el proceso implicado consiste en seleccionar péptidos que sean importantes para el agente causal en el establecimiento de las enfermedades infecciosas correspondientes. Idealmente, este tipo de vacunas deberán contener epitopos para linfocitos B –importantes para inducir una respuesta humoral– y epitopos para linfocitos T –para inducir la reproducción de linfocitos T cooperadores y CTLs–; el enfoque anterior se asociaría a incrementos de la especificidad para cada patógeno, no

induciría reacciones cruzadas con antígenos propios y originaría una inmunidad duradera, sin la necesidad de refuerzos. Además, las citocinas pueden ser empleadas como adyuvantes, lo que generaría efectos sinérgicos con IL-2, GM-CSF o TNF- α en la respuesta de CTLs (como los que se pretenden en algunas vacunas peptídicas contra el HIV) (5, 9, 38, 74, 118, 171).

Una nueva variante ha surgido en relación con algunas vacunas lipopeptídicas; éstas no requieren de un adyuvante adicional y han resultado muy interesantes; en particular, la modificación de los péptidos sintéticos derivada de la envoltura de HIV-1 y en la cual se insertó un lipopéptido, dio lugar a sustancias capaces de inducir una respuesta de CTLs en ratones, sin la necesidad de utilizar adyuvantes (5, 20, 118, 171).

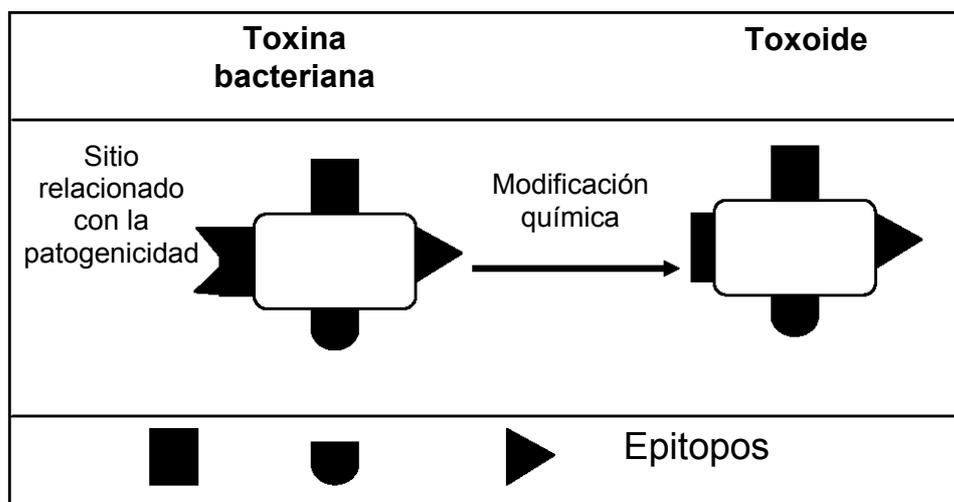
Vacunas con toxinas inactivadas (toxoides)

La producción de toxinas bacterianas es responsable de un importante grupo de enfermedades, entre las cuales se cuentan el cólera, la tosferina y el ántrax. Cuando una bacteria produce algún padecimiento con base en la producción de exotoxinas, la purificación e inactivación química o genética de estas últimas ha llegado a originar vacunas altamente efectivas. Dos de ellas, la tetánica y la diftérica están constituidas por toxinas a las cuales se inactivó mediante un tratamiento químico, que no destruye a las principales determinantes antigénicas (consultar la figura 7).

La inmunización con dichos toxoides desencadena la producción de anticuerpos que neutralizan a la toxina mediante el bloqueo y modificación del sitio activo (76, 151, 167).

En el caso del cólera, la fracción B de la toxina no es tóxica; ésta es producida por ingeniería genética para aplicarla como parte de una nueva vacuna, la cual pretende interferir la unión de la toxina con sus células “blanco” de la mucosa intestinal. Por su parte, el ántrax no corresponde a una enfermedad relevante en humanos, pero el eventual inicio de una guerra biológica o de ataques bioterroristas mantiene el interés en el desarrollo de alguna vacuna; el antígeno más importante deriva de una proteína de la toxina, conocida como antígeno protector (AP), la cual ha proporcionado resultados satisfactorios, al proteger a animales y humanos contra el ántrax cutáneo (76, 151).

Figura 7. Modificación de una toxina en toxoide (167).

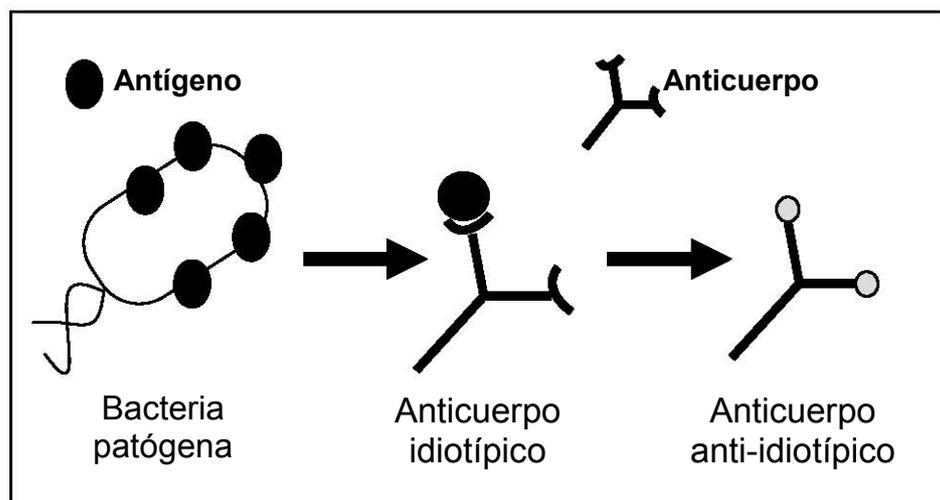


Vacunas anti-idiotipo

Este tipo de vacunas se basan en el hecho que los idiotipos o estructuras antigénicas presentes en la región variable (V) de los anticuerpos, funcionan a su vez como antígenos; por tal motivo, pueden inducir una respuesta de otros anticuerpos, los cuales se denominan anti-idiotípicos (consultar figura 8) (1, 115, 116).

En general, una ventaja de las vacunas anti-idiotipo es la de inducir una respuesta inmune con memoria, además, resultan de gran utilidad contra agentes patógenos con alto grado de mutación, por ejemplo el virus de la gripa; sin embargo, su principal desventaja es la de requerir varias dosis de refuerzo para generar una inmunidad mediada por células T (115, 116).

Figura 8. Vacunas anti-idiotipo (164).



Vacunas del ADN recombinante

Las nuevas metodologías relacionadas con el desarrollo de vacunas no se basan en la utilización de microorganismos completos, sino en el uso de moléculas de ADN recombinante; en esta categoría destacan:

- I. El uso de la tecnología de ADN recombinante para la producción de antígenos de bacterias, plantas o células animales. En primer lugar, se identifica la proteína que genera una respuesta inmune protectora y se localiza el gen que codifica para su síntesis; este se secuencía y se produce mediante técnicas de ingeniería genética, posteriormente, el ADN se liga a un vector apropiado y se introduce en otro microorganismo que lo produce en grandes cantidades. En 1986, la primera vacuna recombinante de subunidades del antígeno de superficie de la Hepatitis B, producido en *Saccharomyces cerevisiae*, obtuvo su registro de venta (118, 124).
- II. El uso de la tecnología de ADN recombinante para modificar microorganismos vivos: mediante mutaciones o deleciones de los genes responsables de la etiología de la enfermedad (118).
- III. El uso de vacunas de ADN desnudo, consistentes en un plásmido de ADN en el cual se encuentran los genes de interés contra un agente patógeno (118).
- IV. La utilización de péptidos sintéticos (124).

V. La producción de vacunas recombinantes sintéticas, las cuales se basan en la unión de oligonucleótidos sintéticos que codifican para epitopos importantes, insertados en un vector adecuado para su expresión (5).

III. VACUNACIÓN CON ADN

La gran evolución de los patógenos se ha basado esencialmente en el perfeccionamiento de los diversos mecanismos a través de los cuales evaden al sistema inmune del hospedero, situación que ha venido complicando la innovación y el desarrollo de vacunas vía las herramientas que se aplicaban anteriormente.

En este contexto, la vacunación con ADN representa una novedosa y prometedora estrategia que podría significar la respuesta requerida para neutralizar o prevenir numerosos padecimientos asociados a microorganismos, especialmente virulentos que incluyen a parásitos intracelulares estrictos y facultativos.

i. Bases fundamentales de la vacunación con ADN

Hasta hace algún tiempo, se pensaba que la inoculación de ADN exógeno al interior de una célula hospedera implicaría la hidrólisis inmediata de dicha molécula por parte de las ADNasas celulares. Sin embargo, interesantes investigaciones realizadas por J. Wolf y cols demostraron lo contrario, inyectando plásmidos de ADN por vía intramuscular en ratones (89, 137).

Los plásmidos implicados contenían los siguientes genes informadores¹: cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa y beta-galactosidasa (β -gal), para proteger a dichos plásmidos de la degradación enzimática, éstos se recubrieron con lípidos catiónicos, aunque sólo en el “lote problema”, ya que también se trabajó paralelamente con un “lote control” al que se le administró el ADN desnudo. Teóricamente, la expresión de los genes resultaría mayor en el “lote problema”, aunque ello resultó superior en el “grupo control”, sin que pudiera establecerse la razón; por obvio, lo antes descrito sentó un precedente particularmente útil en el campo de la vacunación con ADN (99, 187).

Las vacunas de ADN, también denominadas vacunas génicas, polinucleotídicas o de ácidos nucleicos² (ADN o ARNm), se conforman por plásmidos de ADN (pADN) que contienen al gen o genes de interés, localizados comúnmente mediante *vacunología inversa*. Una vez que se inocula ocurre la transfección hacia los diferentes tipos de células del hospedero, lo que implica que el ADN exógeno alcance el citoplasma de las células “blanco” y, secuencialmente, el núcleo, en donde tiene lugar la transcripción, con la participación de la ARN polimerasa II y de otras proteínas accesorias presentes en la propia célula hospedera; por último, el ARNm es traducido para dar lugar a la proteína correspondiente. El procedimiento

¹ Los genes informadores (del inglés *reporter gene*) codifican proteínas con actividad enzimática, las cuales al ser medidas permiten realizar un análisis sencillo de los cambios transcripcionales.

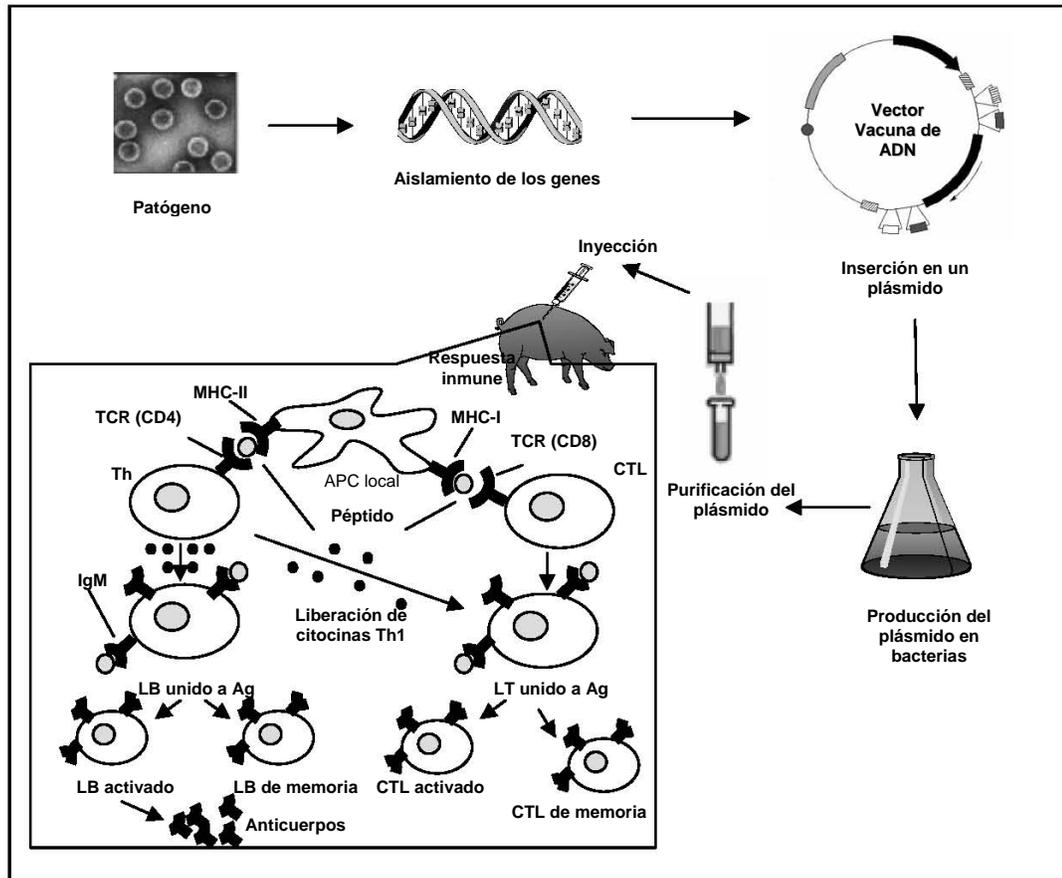
² Nomenclatura utilizada por la OMS

general se resume en la figura 9 y los detalles serán descritos en los capítulos posteriores (9, 65, 157).

Tal como se ha venido mencionando, la inmunización con ácidos nucleicos incluye la posibilidad de administrar ADN o ARNm; no obstante, el uso de vacunas conformadas por ARNm tiene una aplicación limitada, habida cuenta que su vida media es corta, lo que determina una baja efectividad en cuanto a la inducción de la respuesta inmune (113).

Por el contrario, varios estudios realizados en modelos animales han demostrado ampliamente la eficacia de las vacunas de ADN desnudo, aunque esos promisorios resultados no han podido extenderse a los seres humanos. Es precisamente este tópico el que se encuentra sujeto a varios estudios tendientes a solucionar el problema y al cual se asocia la búsqueda de la optimización de sistemas de liberación, el establecimiento de las vías de administración más adecuadas, la potenciación de la expresión del antígeno implicado, el conocimiento de los mejores esquemas de inmunización y los adyuvantes apropiados.

Figura 9. Esquema general de la vacunación con ADN (149).



La vacunación con ADN desencadena una respuesta inmune humoral y una inmunidad mediada por células (CMI), con participación de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, e inclusive, no implica riesgos de reversión de la patogenicidad, tal como ocurre con las vacunas atenuadas. Lógicamente, este método de inmunización podría cambiar el concepto de profilaxis y abre las puertas al posible tratamiento de varias enfermedades, cuya erradicación es particularmente complicada. La tabla 4 muestra un comparativo entre las diferentes estrategias de vacunación. (81, 113, 167).

Tabla 4. Comparación de las estrategias actuales de vacunación (81).

Tipo de vacuna	Microorganismos atenuados	Microorganismos inactivados	Proteínas recombinantes	Vectores recombinantes	Péptidos sintéticos	ADN
Producción	El agente patógeno es cultivado bajo condiciones extremas, hasta obtener cepas no virulentas	El agente patógeno es inactivado con productos químicos o calor	El gen que codifica la proteína antigénica es expresado en bacterias o levaduras	El gen de virulencia se inserta en virus o bacterias atenuadas	Se sintetizan péptidos, los cuales se unen con acarreadores	Los genes que codifican proteínas antigénicas, son insertados en un plásmido
Dosis de Refuerzo	No	Si	Si	Si	Si	Posiblemente
Estabilidad	No muy estable	Estable	Estable	No muy estable	Estable	Muy estable
Tipo de Respuesta inmune	Humoral y celular	Humoral	Humoral	Humoral y celular	Humoral y celular	Humoral y celular
Reversión	Puede revertir a su forma virulenta	No	No	El vector puede revertir a su forma virulenta	No	No
Adyuvantes	No	Si	Si	No	Si	No
Vacunación neonatal	No	No	No	No	No	Si

ii. Plásmidos, componentes esenciales de las vacunas de ADN

Por lo general, las vacunas de ADN están constituidas mayoritariamente por algún plásmido, lo cual hace necesaria la presencia de ciertos elementos para su debido funcionamiento. Naturalmente, dichos plásmidos tienen que producirse utilizando técnicas de ingeniería genética; sin embargo, se han tomado como referencia algunos plásmidos derivados de la bacteria *Escherichia coli* (81, 187).

Los plásmidos son ADN circular de doble cadena, extracromosómicos y de replicación autónoma, los cuales provienen de alguna bacteria preferentemente inocua; es importante tomar en cuenta el hecho de que pueden contener genes modificados genéticamente, a fin de incrementar la eficacia vacunal (182).

La figura 10 muestra un plásmido circular, cerrado covalentemente y de doble cadena, tal como los que se están analizando para la elaboración de vacunas de ADN, por lo que incluye los elementos necesarios para llevar a cabo la expresión de los genes dentro de las células hospederas. En este último aspecto, destacan (79, 89):

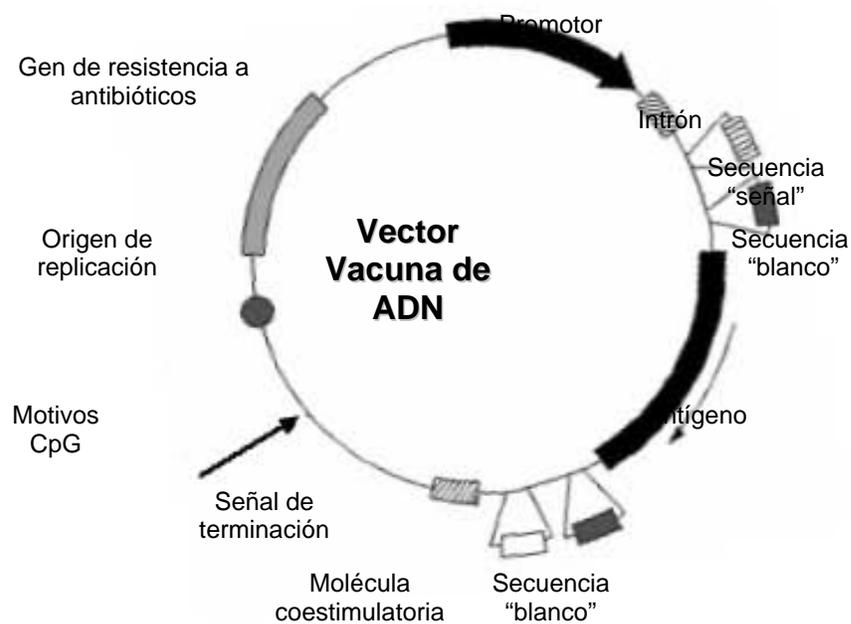
- Un promotor eucariótico, correspondiente al sitio de unión para la ARN polimerasa II y que, por lo tanto, es el responsable de que inicie la transcripción en las células de mamíferos.

- El sitio de clonación, localizado generalmente corriente arriba del promotor y que permite la inserción de los genes en regiones en las que ha ocurrido un previo corte realizado por enzimas de restricción.
- Las secuencias finalizadoras de la transcripción, que garantizan que el ARNm sea terminado apropiadamente y brindan estabilidad a los transcritos de ARN, entre ellas destacan las secuencias de poli A derivadas del virus SV40. Dentro de las vacunas de ADN, estas secuencias afectan los niveles de expresión de los genes, los cuales incrementan –únicamente– al combinarse con secuencias potenciadoras de la transcripción (22, 64).
- Los marcadores de selección, representados con frecuencia por genes de resistencia a antibióticos, los que facilitan la selección de colonias adecuadas entre el cultivo bacteriano; son comunes los genes asociados a ampicilina y kanamicina, ya que resultarían apropiados para su uso en la clínica en virtud de su baja incidencia en efectos adversos. Al contrario de los antibióticos β -lactámicos, por tal razón, debe evitarse su utilización (52, 65).
- El origen bacteriano de replicación, un segmento útil para que el plásmido se pueda replicar en un sistema bacteriano. Por lo regular

se elige al origen de replicación ColE1 –encontrado en los plásmidos pUC de *Escherichia coli*–, pues genera un gran número de copias, permitiendo un alto rendimiento de plásmidos purificados (22, 65).

- Las secuencias inmunoestimuladoras (ISS), entre las que destacan los motivos CpG, los cuales se describen posteriormente
- Las secuencias de ADN que codifican para la síntesis del antígeno de interés, sin duda la fracción más importante de nucleótidos, ya que su expresión resulta indispensable para la prevención de los padecimientos.

Figura 10. Esquema básico de un vector asociado a vacunas de ADN (65).



Si bien los plásmidos han venido representando los vectores de elección para la elaboración de vacunas de ADN, es importante tomar en cuenta que algunas de sus características limitan la eficacia vacunal; en este sentido, deben señalarse las largas secuencias que se requieren para la replicación bacteriana; la presencia de uno o más genes de resistencia a antibióticos, que podrían generar problemas de seguridad si los plásmidos terminan ingresando a bacterias patógenas; y los motivos CpG, los cuales participan como adyuvantes efectivos en algunas aplicaciones, pero contraproducentes en otras (137).

iii. Regulación de los plásmidos utilizados en vacunas de ADN

Evidentemente, los niveles de expresión génica de una vacuna de ADN se correlacionan con el nivel de inmunidad obtenido. De esa misma manera, la optimización de la estructura plasmídica representa una herramienta o estrategia determinante para incrementar el potencial del producto profiláctico y, en tal contexto, a continuación se mencionan algunos elementos que resultan fundamentales para la regulación de la expresión génica en los plásmidos de ADN (9, 116, 182):

- **Promotores**

Puesto que los niveles de inmunidad inducidos por las vacunas de ADN dependen de la fuerza del promotor, la selección de éste resulta de particular interés. En general, los promotores más utilizados son de origen viral, aunque los promotores tejido-específicos tales como los de la β -actina o creatinina cinasa, también han generado buenos resultados; en este sentido, su selección depende del tipo celular y del tejido en el que se pretende que tenga lugar la expresión de los genes (10, 64, 81).

El promotor más empleado hasta ahora es el perteneciente al citomegalovirus humano (HCMV), ya que se ha comprobado que provoca altos niveles de expresión génica –en comparación con otros–, favoreciendo una vasta respuesta humoral. No obstante, es preciso considerar que su actividad puede disminuir en ambientes con altos niveles de TNF- α e INF- γ , lo que representa un grave problema, ya que numerosas enfermedades cursan con elevadas proporciones de este tipo de citocinas inflamatorias; además, la respuesta inmune inducida por los motivos CpG presentes en la estructura plasmídica, llega a suprimir la actividad de los promotores virales. Otros promotores bajo análisis son los de los virus SV40 (*simian virus 40*) y RSV (*Rous sarcoma virus*) (153, 185).

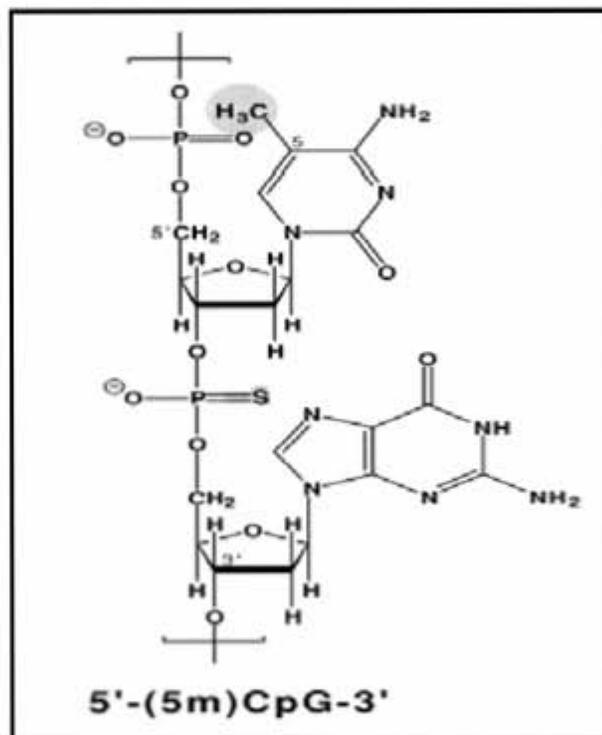
- **Motivos CpG**

Las secuencias inmunoestimuladoras (ISS) se presentan en los plásmidos de ADN bacteriano en forma de hexámeros palindrómicos denominados oligodesoxinucleótidos (ODN); éstos, a su vez, contienen dinucleótidos no metilados, conocidos como motivos CpG (citosina-fosfato-guanina), los cuales están rodeados por dos purinas en la posición 5' y dos pirimidinas en la posición 3'. A este respecto, se ha observado que las purinas GA (en la posición 5'), las pirimidinas TC o TT (en la posición 3') y el hexámero 5'-TG**CG**TT-3' son las secuencias que aportan una mayor eficacia en cuanto a la inmunoestimulación ligada a los motivos antes señalados; sin embargo, las más frecuentes son las secuencias G**AC**GTT –en ratones– y GT**CG**TT –en seres humanos– (74, 121, 139, 154).

Cabe aclarar que los motivos CpG se consideran un patrón molecular altamente conservado en bacterias, responsable de estimular al sistema inmune. Estas secuencias son más frecuentes en el genoma procariótico, donde las citosinas no están metiladas; a diferencia del ADN eucariótico donde su frecuencia es menor y las citosinas se encuentran metiladas en la posición 5, lo que las hace inactivas desde el punto de vista inmunoestimulador (consultar figura 11). En este sentido, la metilación del ADN puede considerarse como un sinónimo de represión transcripcional, mediada por la formación de una cromatina compacta (94, 98, 121, 200).

Tomando en cuenta lo anterior, se piensa que el sistema inmune de los organismos eucarióticos, ha evolucionado para reconocer las secuencias CpG presentes en los genomas bacterianos; ya que su presencia es una señal de peligro, que induce una respuesta inmune innata para impedir la infección (200).

Figura 11. Estructura de los motivos CpG metilados presentes en el genoma humano(176).



Con respecto a las secuencias CpG-ODN, se puede resumir lo siguiente:

- Sin los motivos CpG, los ODN no tienen un efecto importante sobre la inmunogenicidad generada por las vacunas de ADN (116).

- La potencia de las vacunas de ADN, debida al efecto de las secuencias CpG-ODN, depende de la dosis de estas últimas, aunque no en forma proporcional; de hecho, aunque el número de secuencias CpG presentes en el plásmido puede incrementar la respuesta inmune, también es preciso considerar que al aumentarse el tamaño de la molécula plasmídica se limita o se impide su propia entrada a las células hospederas. Así, se ha observado que al introducirse 16 motivos CpG adicionales a la estructura plasmídica, se obtiene una mucha mayor respuesta humoral y celular, que cuando se incorporan 50; en otras palabras, la cantidad de motivos CpG requeridos para mejorar la respuesta inmune aún es desconocida (116, 139, 174).
- La metilación de los motivos CpG inhibe totalmente la potencia de las vacunas de ADN (116).

Mecanismo de acción de los motivos CpG. Las células del sistema inmune innato reconocen al ADN bacteriano –específicamente a los motivos CpG– como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que funcionan como “ligandos” de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de tipo Toll-9 (TLR-9) (1, 74).

Como es sabido, este tipo de receptores se encuentra en la superficie de diferentes células del sistema inmune, incluidos los macrófagos, las células NK y los linfocitos B. Por este motivo, se considera que la estimulación de los linfocitos B por parte de los motivos CpG, resulta importante para el mantenimiento de la memoria inmunológica (89, 176).

Además, los motivos CpG estimulan la proliferación, activación y maduración de las células dendríticas, los monocitos y macrófagos, todos los cuales sintetizan INF- α y β , TNF- α , IL-12 e IL-18, para dar origen a una respuesta Th1. Al mismo tiempo, inducen la síntesis de IL-1, IL-6 e IL-10, contribuyendo a la generación de una respuesta inmune mantenida, debido a que estas citocinas generan un estado de proliferación y resistencia a la apoptosis. Cabe subrayar que la síntesis de IL-12 estimula la liberación de INF- γ por parte de las células NK, lo cual favorece la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B –principalmente los de la clase IgG2a– e induce una importante repuesta de CTLs (112, 139, 176).

Por otra parte, las propias secuencias CpG incrementan la expresión de moléculas MHC-II sobre APCs y, de otras moléculas coestimuladoras tales como CD40, B7-1, B7-2 e ICAM-1, que contribuyen a la activación de la respuesta inmune (200).

Adicionalmente, los motivos CpG han originado gran interés debido a su comprobada actividad adyuvante en mucosas, ya sea que se les administre

por vía oral o intranasal, en donde estimulan una respuesta Th2, caracterizada por la presencia de anticuerpos IgG1 e IgA (57, 65, 139, 165).

- **Motivos neutralizantes**

Cuando los dinucleótidos CpG se encuentran rodeados por una citosina en la posición 5' (**CCG**) o dos guaninas en la posición 3' (**CGGG**), pueden contrarrestar la estimulación asociada a los motivos CpG en las vacunas de ADN. En general, los motivos neutralizantes se han encontrado en algunos serotipos de adenovirus y, al parecer, surgen como un mecanismo viral de evasión que suprime las propiedades inmunoestimuladoras de los motivos CpG (154, 174, 176).

Por lo regular, los motivos neutralizantes son 2 a 5 veces más frecuentes en el genoma humano y pueden regular los efectos inmunoestimuladores de los motivos CpG. Por ello, la inmunogenicidad de las vacunas de ADN podría depender del equilibrio entre las dos clases de motivos presentes (estimuladores y neutralizantes). Al menos en teoría, la optimización de la respuesta inmune ligada a las vacunas de ADN tendría que tomar en cuenta el incremento de motivos CpG y/o la reducción los neutralizantes (6, 154, 174).

- **Secuencias Kozak**

Durante la síntesis proteica, las secuencias que rodean al codón de inicio AUG del ARNm influyen en el reconocimiento de esta molécula, por parte de los ribosomas eucarióticos; entre ellas, la secuencia consenso ($^{-6}\text{GCCA/GCCAUGG}^{-6}$) conocida como “Kozak”, puede ser incluida cerca del codón de inicio para potenciar la transcripción y expresión de los genes en las vacunas de ADN (64, 65, 99).

- **Uso de codones**

Si bien es claro que los codones dirigen la inserción de aminoácidos durante la síntesis de proteínas, su frecuencia depende del microorganismo que los emplea. Por obvio, bacterias taxonómicamente cercanas tales como *Escherichia coli* y *Salmonella* utilizan codones similares y, desde luego, muy diferentes a los de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin lugar a dudas, esta clase de efectos afectaría el nivel de expresión de unos genes procarióticos en células de mamíferos (10, 64).

En otras palabras, una estrategia para mejorar la expresión génica incluiría la optimización del uso de los codones, habida cuenta que la concentración intracelular del ARNt varía significativamente de un organismo a otro. En general, la presencia de codones poco comunes para ARNt de baja abundancia, disminuye drásticamente la síntesis de la proteína implicada y,

desde luego, el cambio de codones poco comunes, a través de mutaciones o genes sintéticos, incrementaría la expresión de los genes (65).

Por último, diversos estudios han confirmado que la optimización en el uso de los codones está relacionado con la concentración de las proteínas sintetizadas y, por lo tanto, con la respuesta inmune asociada a las vacunas de ADN (99, 165, 185, 197).

- **Secuencias intensificadoras o potenciadoras**

Las regiones potenciadoras de la transcripción son elementos de regulación, que se encuentran ligadas al origen de replicación y al interactuar con proteínas reguladoras, pueden activar al promotor e iniciar eficazmente la transcripción. Lo anterior significa que estas secuencias permiten que las células sinteticen un mayor número de copias de un gen en particular (99, 116, 165).

A tal respecto, la inserción de secuencias potenciadoras dentro de las vacunas de ADN, aumenta la expresión antigénica alrededor de 20 veces y, con ello, la respuesta inmune; por ejemplo, el intensificador del virus SV40, contribuye a alcanzar tasas máximas de transcripción (99, 65).

- **Intrones**

Los intrones son secuencias no codificadoras que resultan de gran interés en la vacunación con ADN, debido a que incrementan notablemente la cantidad de la proteína antigénica sintetizada. Al compararse los niveles de expresión *in vitro*, en presencia y ausencia del intrón A del HCMV, se observó que su participación fue determinante para la expresión génica. Si bien no se conoce el mecanismo mediante el cual actúa dicho intrón, al parecer éste contribuiría con diversas señales que mejorarían el proceso de transcripción ante la deficiencia de ARNm (10, 99).

iv. Vectores MIDGE

Los vectores MIDGE³ se componen por ADN lineal de doble cadena y contienen toda la información necesaria para realizar la expresión de su carga génica. En general, son más pequeños que los plásmidos, con una longitud promedio de 1,000 a 1,200 pb, lo que les permite atravesar con mayor facilidad las membranas celulares; además, pueden ser producidos directamente y a gran escala, por lo que representan una gran alternativa para la vacunación de ADN (137).

³ MIDGE = Expresión génica mínima definida inmunológicamente.

Como es sabido, la envoltura nuclear regula el transporte activo y pasivo, dentro y fuera del núcleo, a través de sus estructuras denominadas complejos poro-nucleares (NCPs), las cuales favorecen el paso de moléculas pequeñas. En contraste, las moléculas grandes tales como las proteínas mayores de 45 kDa requieren de la participación de secuencias de localización nuclear (NLS) para lograr atravesar hacia el núcleo, mediante un proceso dependiente de ATP (10, 137).

De acuerdo con lo anterior, las NLS han sido unidas a vectores MIDGE, buscando reducir la dosis e inducir una respuesta inmune efectiva –humoral y celular–, e inclusive, tratando de generar una respuesta Th1 utilizando la vía intradérmica (10, 137).

v. Expresión de antígenos múltiples: sistemas multivalentes

En relación con algunos patógenos, la expresión de un solo gen no resultaría suficiente para proteger al hospedero; consecuentemente, se pueden requerir antígenos adicionales que den lugar a una amplia cobertura inmunológica, desencadenada por la incorporación de múltiples epitopos en una misma vacuna de ADN (197,155).

Las opciones utilizadas para la elaboración de vacunas de ADN como sistemas multivalentes incluyen la inoculación de varios plásmidos, que codifiquen para antígenos del mismo o de diferentes patógenos, o bien, una expresión múltiple del plásmido, lo que implicaría que uno solo codificara para todos los antígenos deseados. En este último caso, serían necesarias múltiples unidades transcripcionales independientes (incorporadas en un único plásmido), cada una con su propio promotor y su señal de poliadenilación (121, 157).

Sin lugar a dudas, el diseño de vacunas de ADN como sistemas multivalentes es de gran interés, sobre todo para la protección contra enfermedades tales como malaria, SIDA y TB, para las cuales se ha demostrado ampliamente que la expresión de un antígeno único no ofrecería garantía alguna.

El desarrollo de la primera vacuna multivalente de ADN se constituyó por antígenos de los virus de la influenza, herpes simplex y respiratorio sincicial; en general, se considera que ésta brindó buenos resultados, ya que la respuesta originada proporcionó protección contra cada uno de los patógenos involucrados (45).

vi. Manufactura de las vacunas de ADN

Si bien para un biólogo molecular la producción de ADN a “gran escala” se encuentra generalmente en un rango de 10 a 100 mg, la cifra para un farmacéutico puede exceder los 50 g por lote, dependiendo de su demanda. Por esta razón, la manufactura de las vacunas de ADN debe considerar las características propias del plásmido –su tamaño y conformación–, así como, la cepa hospedera en la que se realizará el cultivo y la purificación a nivel industrial (60).

Con respecto a la conformación del plásmido vacunal, se ha observado que aquella afecta de forma diferente la expresión del antígeno. En general, la forma superenrollada facilita la transcripción, debido principalmente a que es más compacta y estable físicamente; sin embargo, dentro de las células, dicha conformación únicamente se produce por acción de las enzimas denominadas topoisomerasas, lo cual difiere del laboratorio, en donde se logra mediante diferentes condiciones de cultivo (99, 117).

Otro factor a considerar en la manufactura de las vacunas de ADN reside en el tamaño del plásmido, ya que éste es inversamente proporcional a la eficiencia de transformación. Es decir, los plásmidos pequeños son preferibles y, por lo general, su tamaño debe ser menor de 10 Kb (149).

Posteriormente, se realiza la construcción del plásmido y la selección del microorganismo utilizado para su producción, tomando en cuenta sus condiciones óptimas de crecimiento. Las etapas anteriores se agrupan en la fase denominada de preparación, en tanto que, las siguientes, de aislamiento y purificación de los plásmidos, se ubican en la fase de recuperación (60, 153, 182).

En relación con la fase de recuperación, la optimización del vector de expresión, así como la adecuada elección del microorganismo y de sus condiciones de cultivo, permitirán acceder a buenos rendimientos (220 mg/L) y a reducir en un 40% el contenido del ARN –durante la lisis celular–; por lo regular, la producción de plásmidos bajo condiciones subóptimas de laboratorio se asocia a bajos rendimientos (5-40 mg/L) (60, 117,153).

En cuanto a la selección del microorganismo, la bacteria *Escherichia coli* contiene todos los requerimientos intracelulares necesarios para la producción de los plásmidos a gran escala. Por su parte, la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante en el control del número de copias, en la estabilidad y en la cantidad de plásmido producido; en otras palabras, los medios de cultivo especialmente diseñados para la sobreproducción suelen incrementar la estabilidad y generar altos rendimientos, ya que favorecen las formas superenrolladas de los plásmidos (117, 153).

La lisis celular es un paso crítico en el proceso de recuperación del plásmido, ya que los componentes intracelulares liberados incluyen precisamente a los plásmidos en sus diferentes conformaciones (lineal, relajada, desnaturalizada), ARN y ADN del microorganismo, endotoxinas y proteínas. Sin embargo, la alta fragilidad plasmídica y de las moléculas de ADN del microorganismo, representan un gran problema durante la producción (117).

En general, el procedimiento de lisis alcalina con SDS⁴ ha representado el método de elección para llevar a cabo la lisis celular, pues permite la ruptura de la membrana y libera los componentes celulares; posteriormente, una neutralización precipita proteínas y ácidos nucleicos. El pH elevado asociado a este procedimiento facilita la degradación de ARN; sin embargo, el aumento debe controlarse para que no se degrade el plásmido. De igual forma, el uso de ARNasas reduce el contenido de ARN, aunque agrega costos económicos (60, 153).

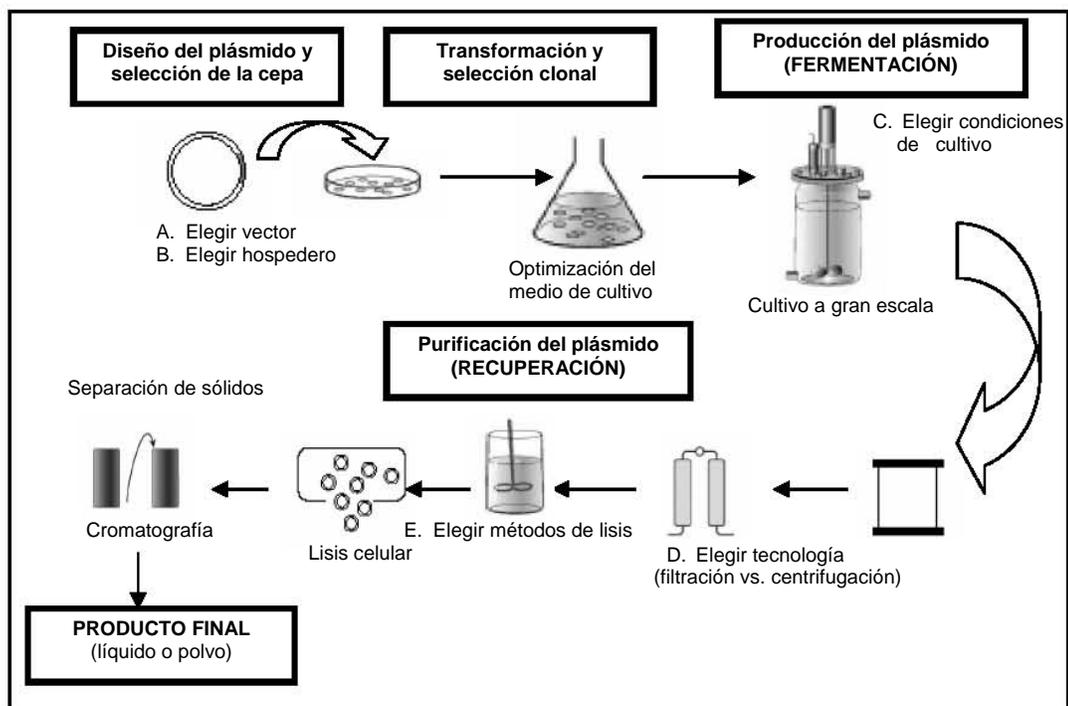
Después de la lisis celular, se lleva a cabo el proceso de purificación, que incluye la clarificación y concentración del producto –eliminando desechos celulares, proteínas desnaturalizadas y ácidos nucleicos del microorganismo–. En este sentido, la clarificación se puede realizar mediante centrifugación, aunque no es conveniente en la producción de plásmidos a gran escala y se prefiere la filtración. Por último, la cromatografía de afinidad se ha utilizado

⁴ SDS (docecil-sulfato de sodio): detergente aniónico capaz de romper enlaces no covalentes.

para concentrar el producto, ya que aprovecha la carga e hidrofobicidad de los ácidos nucleicos, favoreciendo un mejor rendimiento (60, 153, 199).

La figura 12 muestra un esquema general del proceso de producción de plásmidos para vacunas de ADN.

Figura 12. Producción de plásmidos para vacunas de ADN (60).



Cabe señalar que el producto final debe cumplir toda una serie de especificaciones, las cuales son verificadas mediante pruebas de control de calidad. Es preciso considerar que, a este nivel, los términos contaminante e impureza son diferentes: ésta corresponde a una sustancia no deseada derivada del microorganismo, durante el proceso de lisis celular –por ejemplo,

proteínas y endotoxinas–; por su parte, un contaminante corresponde a una sustancia no deseada externa al sistema –por ejemplo, virus, residuos de disolventes orgánicos o “ligandos” que pueden filtrarse de las matrices durante la cromatografía– (60).

Algunas especificaciones requeridas para utilizar plásmidos como vacunas son: estar libre de proteínas –que pueden estimular la generación de anticuerpos contra el plásmido–, ARN y endotoxinas bacterianas –que pueden desencadenar una actividad biológica de consecuencias patológicas–. Dichas especificaciones varían dependiendo de la agencia regulatoria, pero algunos ejemplos de ellas se pueden observar en la tabla 5. (117, 182).

Tabla 5. Requerimientos de pureza para vacunas de ADN (153).

Contaminante	Especificación
Plásmidos covalentemente cerrados	> 90%
ADN genómico de <i>E. coli</i>	<1%
ARN	<0.1%
Endotoxinas	<0.5 Endotoxinas/ mg plásmidos de ADN
Proteínas	<1%

vii. Vías de administración

La biodistribución de las vacunas de ADN en el organismo constituye un elemento trascendental que depende de diferentes factores, incluyendo la vía de administración, la formulación, los sistemas de liberación y las propiedades fisicoquímicas del plásmido implicado (92, 168).

En cuanto a las vías de administración, se han estudiado varias de ellas, tales como la intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intranasal (i.n.), oral, vaginal, si bien se ha coincidido que las dos primeras resultan las más efectivas. A continuación se realiza un breve análisis de los aspectos fisiológicos asociados a los principales tejidos “blanco” de las distintas vías de administración (89, 187).

- **Músculo esquelético**

Esta clase de tejido no se considera importante desde el punto de vista inmunológico, debido a su carencia en células presentadoras de antígeno (APCs); consecuentemente, la vacunación con ADN por esta vía requiere de grandes dosis para generar una respuesta inmune adecuada. Sin embargo, se piensa que las células musculares (miocitos) transfectadas pueden elaborar y liberar al inmunógeno en forma permanente, lo que estimularía a las APCs concentradas en otros órganos y tejidos vecinos o distantes (46, 187).

Cabe señalar que diversos estudios preclínicos indican que las vacunas de ADN inyectadas por vía i.m. se distribuyen predominantemente en los tejidos altamente vascularizados, aunque su persistencia por lapsos prolongados ocurre únicamente en el sitio de inyección (168, 187).

- **Piel**

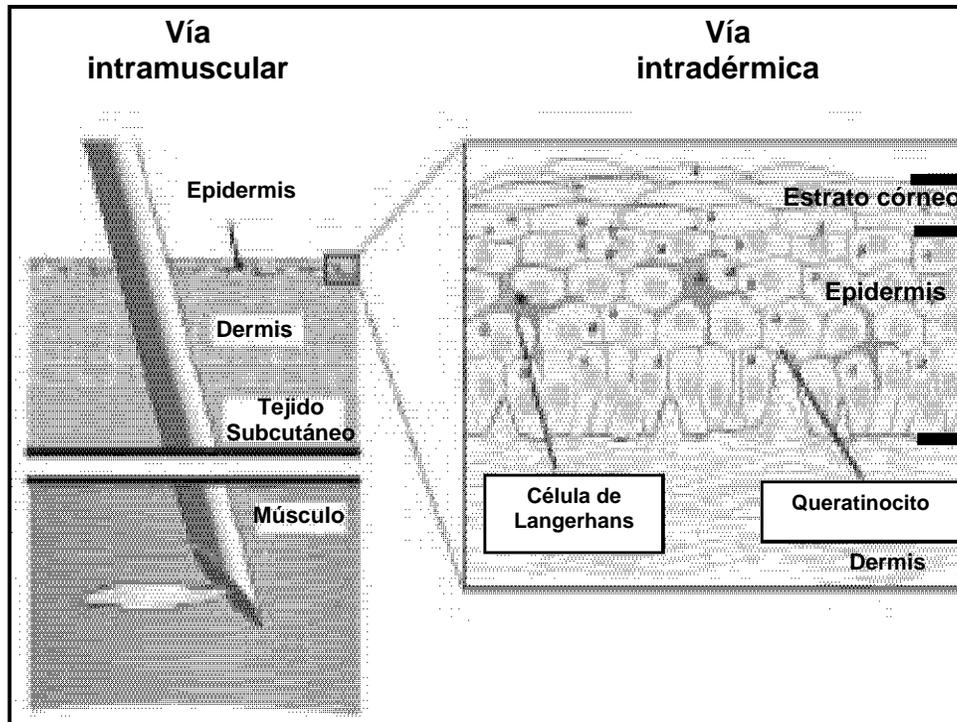
La piel íntegra (sin escoriaciones u otras lesiones) representa una barrera física importante, que impide la entrada a diversos patógenos, pero también representa un órgano importante en virtud de que contiene células especializadas en cuanto a la iniciación de la respuesta inmune (1, 67).

Cuando se emplea la vía intradérmica o subcutánea, el antígeno es depositado debajo de la dermis o en la interfase ubicada entre ésta y la epidermis (46, 63).

A tal respecto, la dermis consta principalmente de tejido conectivo, aunque también es muy importante su contenido en linfocitos T (CD8+ y CD4+) y macrófagos. La propia epidermis –la capa más externa de la piel– incluye queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans (LCs) y linfocitos T intraepidérmicos (consultar figura 13) y, si bien los dos primeros grupos celulares no parecen ser mediadores relevantes en cuanto a la inmunidad adaptativa, la producción de IL-1, TNF- α y GM-CSF por parte de los queratinocitos contribuye a mejorar la respuesta inmune innata y activa

linfocitos, macrófagos y células dendríticas como respuesta a numerosas infecciones (1, 46, 63).

Figura 13. Estructura de la piel (46).



Por su parte, las células de Langerhans son células dendríticas (DCs) inmaduras cuyo papel es trascendental en la inducción de la respuesta inmune: al detectar antígenos extraños o ser estimuladas por citocinas inflamatorias retraen sus prolongaciones, pierden su adhesividad a las células epidérmicas y migran hacia la dermis, e inclusive, a los nódulos linfáticos, en donde son activadas y evidencian su natural función como presentadoras de antígeno a los linfocitos T CD8+ y CD4+ (46, 187).

Lógicamente, cuando las LCs no entran en contacto con antígenos permanecen en la epidermis, expresando bajos niveles de moléculas coestimuladoras y de moléculas de MHC clase I o II. (46, 187).

Finalmente, es preciso considerar que, en la piel, la abundancia, localización y actividad de las LCs presentes en la epidermis, contrasta con la menor vascularización y baja densidad de los nervios sensoriales, lo que hace de todo este tejido un importante “blanco” para la deposición de vacunas de ADN, ya que se evita el sangrado y la administración resulta menos dolorosa (46).

- **Mucosas**

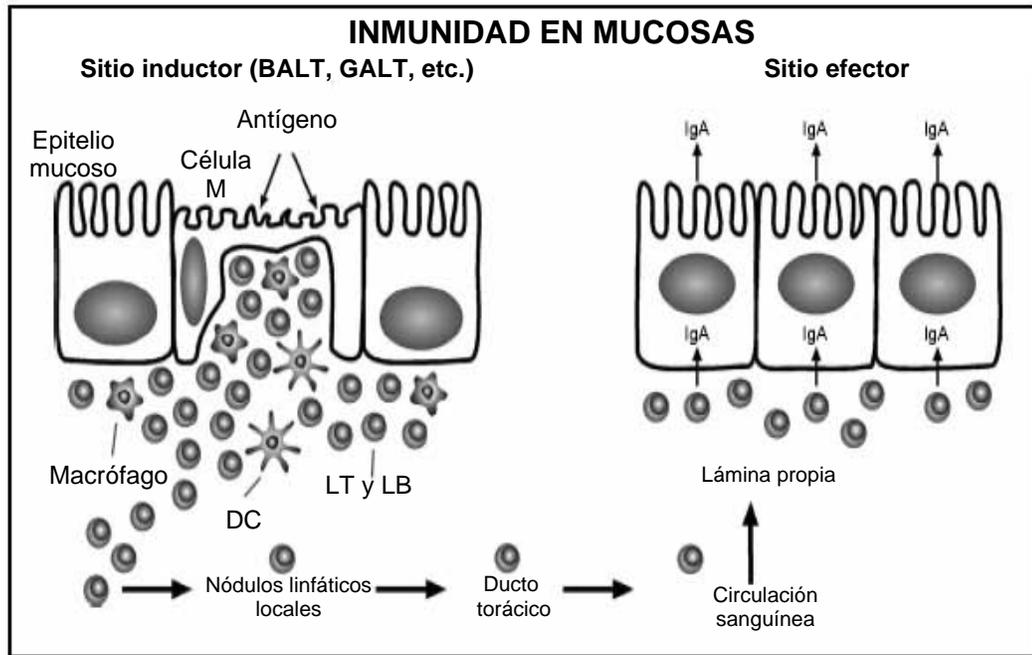
Las membranas mucosas que recubren a los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario representan el primer punto de contacto con antígenos inhalados, ingeridos o transmitidos por vía sexual. Evidentemente, el desarrollo de una fuerte inmunidad en estas zonas es de gran importancia, para combatir y neutralizar a diversos agentes infecciosos (67, 165).

En general, el sistema inmune de las mucosas se constituye por tejidos linfoides locales, tales como el denominado GALT (tejido linfoide asociado al intestino), NALT (tejido linfoide asociado a mucosa nasal), BALT (tejido linfoide asociado a bronquios), mejor conocidos globalmente como MALT (tejido linfoide asociado a las mucosas) (22).

La columna vertebral de dicho MALT inicia con unos fagocitos naturales denominados células M (por membranosas), que captan toda clase de antígenos –macromoléculas, micropartículas o microorganismos– presentes en la luz intestinal y los transfieren a los macrófagos y a las DCs, células que llevan a cabo su eficaz función de procesar al antígeno implicado y presentarlo a los linfocitos T; éstos a su vez estimularán a los linfocitos B, dispersos o agrupados en forma de agregados que conforman las placas de Peyer en la lámina propia (1, 31, 63, 81, 90).

Cabe aclarar que la entrada de un antígeno a las membranas mucosas, induce la producción predominante del anticuerpo efector IgAs (inmunoglobulina A secretoria), el cual es capaz de cruzar las membranas epiteliales y prevenir futuros problemas con el patógeno involucrado. Además, los linfocitos activados en las mucosas migran a los nódulos linfáticos locales obedeciendo a la circulación sanguínea y, desde allí, a otras regiones de la mucosa; en otras palabras, la inmunidad generada en alguna región de las mucosas, puede extenderse hasta otras (consultar la figura 14) (22, 44).

Figura 14. El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) (22).



La posibilidad de administrar las vacunas de ADN en forma de gotas o de spray tiene aplicaciones importantes, ya que las vías oral e inhalatoria figuran entre las de mayor acceso para los patógenos; en tal contexto, se busca que las formulaciones administradas por las vías oral e i.n. liberen al ADN en las membranas mucosas, lo protejan de la digestión enzimática y sean efectivas en cuanto a la inducción de anticuerpos IgAs (116).

En relación con lo anterior, las investigaciones actuales incluyen plantas transgénicas como sistema de liberación. Por ejemplo, el desarrollo de la vacuna contra el virus *Norwalk*⁵ implica a genes que codifican para proteínas antigénicas del virus, los cuales se introducen en plantas de tabaco y papa;

⁵ Un importante agente etiológico de gastroenteritis que afecta principalmente a niños.

posteriormente, los extractos de estas plantas son utilizados para inmunizar a ratones, lo que desencadena una respuesta inmune humoral en la que predominan anticuerpos IgG e IgA específicos contra el virus. La principal desventaja de la administración de las vacunas de ADN por esta vía reside en que se requieren dosis muy elevadas para estimular la respuesta inmune (81).

Por otra parte, entre las ventajas de la administración vacunal en mucosas figuran la facilidad de la aplicación, una menor invasividad del organismo y la reducción en el riesgo de contaminación asociado a las inyecciones, todo lo cual la hace elegible para utilizarla en las extensas campañas de vacunación. No puede pasarse por alto el hecho de que la respuesta inmune inducida en un sitio de las membranas mucosas puede extenderse a otros (22, 81).

viii. Respuesta inmune

La respuesta inmune innata, primera barrera a la que se enfrentan los microorganismos, suele no ser suficiente para evitar la infección, razón por la cual son indispensables otros mecanismos asociados a la participación de los linfocitos B y T, elementos indispensables en relación con la respuesta inmune adaptativa (1, 94, 167).

Dependiendo del antígeno involucrado, los linfocitos B se encargan de producir anticuerpos de diferentes isotipos, línea de acción y especificidad; por su parte, los linfocitos T se dividen en dos poblaciones: los T citotóxicos (CTLs), que presentan el marcador CD8 y se encargan de destruir a las células propias infectadas con microorganismos intracelulares; y los T cooperadores (Th), con un marcador de superficie CD4 y cuya función consiste en activar macrófagos y estimular la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. A su vez, los linfocitos Th se dividen en Th1 y Th2, en cuanto a sus funciones, la producción de INF- γ por los linfocitos Th1 incrementa la actividad de los fagocitos; mientras que los linfocitos Th2 estimulan la producción anticuerpos IgE –asociados con reacciones alérgicas– (1, 94, 167).

Las citocinas presentes en el medio externo influyen en la diferenciación de los linfocitos T inmaduros (Th0 o naive), tal como se observa en la tabla 6 (1, 165).

Tabla 6. Tipo de respuesta inmune adaptativa (164).

Tipo de respuesta	Perfil de citocinas	Activan
CD4+Th1	IL-2, INF- γ , TNF- α	Macrófagos Síntesis de IgG2a
CD4+Th2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13	Linfocitos B Síntesis de IgG1 e IgE
CD8+CTLs	INF- γ , TNF- β , TNF- α	

Las respuestas funcionales de los linfocitos T inician con el reconocimiento de complejos péptido-MHC a través del “receptor de las células T” (TCR) (167).

Por lo que respecta a los antígenos derivados de virus y bacterias intracelulares, después del procesamiento correspondiente, los péptidos resultantes son presentados por moléculas de MHC-I en la superficie de las células nucleadas; el complejo péptido-MHC-I es reconocido por el TCR de linfocitos T CD8+, lo que genera la primera de las dos señales requeridas para la proliferación de estos últimos; la segunda señal consiste en las moléculas coestimuladoras elaboradas y liberadas por las APCs⁶ presentes en el sitio de la infección, las cuales determinan la lisis celular (1, 94, 167).

Tocante a los antígenos extracelulares –correspondientes generalmente a bacterias extracelulares y toxinas–, los péptidos son presentados por moléculas de MHC-II y, posteriormente, el complejo péptido- MHC-II es reconocido por el TCR de los linfocitos T CD4+; estas últimas células se activan a través de señales coestimuladoras y, a su vez, pueden desencadenar la estimulación de las células productoras de anticuerpos o una reacción preferentemente inflamatoria (94).

Las DCs juegan un papel fundamental en la inmunidad generada por las vacunas de ADN –aún cuando sólo representan un tercio de la masa tisular–,

⁶ Las APCs son células especializadas en capturar microorganismos, presentarlos a los linfocitos y proporcionar señales que estimulan la diferenciación de los linfocitos, entre ellas: DCs, linfocitos B y macrófagos.

ya que son capaces de fagocitar virus, bacterias y algunas micropartículas, presentar antígenos procesados vía MHC-I o MHC-II a los linfocitos T correspondientes y, con ello, determinar la naturaleza de la respuesta inmune: humoral, celular o tolerancia inmunológica, es decir, la falta de respuesta del sistema inmune ante un antígeno, inducida por el contacto previo con dicho antígeno en una dosis y frecuencia determinada. Cabe agregar que la maduración de las DCs, así como su migración a los nódulos linfáticos, pueden ser inducidas por factores inflamatorios tales como los LPS, el ADN bacteriano y diversas citocinas (6, 92).

Respuesta inmune en la vacunación con ADN

Tal como se mencionó anteriormente, el éxito de cualquier vacuna depende, entre otras características, de que la respuesta inmune a que da lugar sea específica y permanezca por lapsos prologados; en este sentido, la vacunación con ADN origina una respuesta inmune muy específica que involucra tanto a la rama celular como a la humoral.

La inmunidad humoral asociada a la vacunación con ADN incluye principalmente anticuerpos de la clase IgG con bajos niveles de IgA e IgM en suero; además, los bajos pero persistentes niveles de expresión de la proteína antigénica determinan una mezcla de linfocitos B de memoria con una afinidad relativamente alta y una respuesta de CTLs que puede permanecer por más de 2 años. Así lo demuestran numerosos trabajos realizados en ratones, lo

que ha conducido al consenso de que las vacunas de ADN representan una excelente herramienta en la lucha contra diversas enfermedades (137, 167).

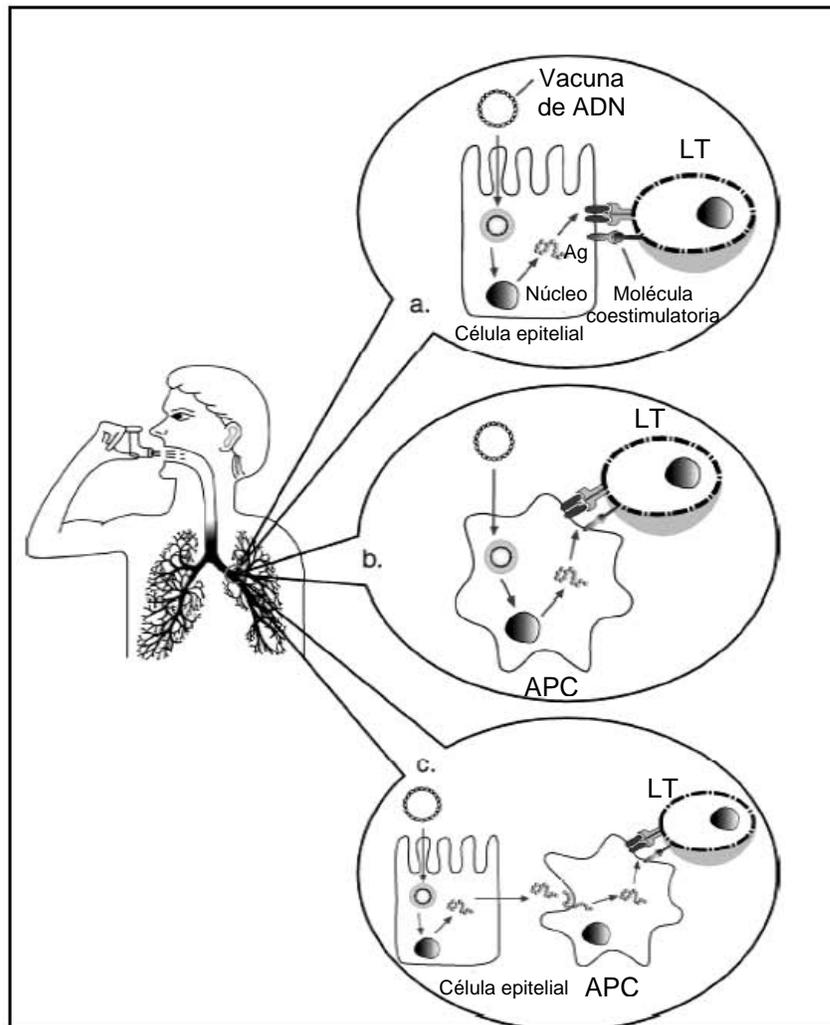
En resumen, a continuación se enlistan los tres mecanismos hipotéticos asociados a la respuesta inmune posterior a la vacunación con ADN (consultar la figura 15) (98, 187):

- a. *Reconocimiento antigénico por los CTLs en células somáticas.* Incluye la expresión de la proteína, su procesamiento, e incluso, su presentación a los linfocitos T CD8+, a través del MHC-I de dichas células somáticas (65, 94).

- b. *Presentación antigénica a linfocitos T por parte de las APCs.* Las DCs son transfectadas directamente, posteriormente, procesan y presentan el antígeno a los linfocitos T, vía las moléculas de MHC-I o MHC-II (65, 94).

- c. *Presentación cruzada (cross priming).* Las células somáticas transfectadas expresan y secretan la proteína antigénica, la cual es fagocitada por las APCs para dar lugar a la respuesta inmune (65, 94).

Figura 15. Mecanismos teóricos asociados a la respuesta inmune en las vacunas de ADN (22).



Reconocimiento antigénico por los CTLs en células somáticas

Las células somáticas presentes en el lugar de inoculación, particularmente los miocitos, los queratinocitos y las células epiteliales, pueden ser transfectadas en mayor proporción mediante la vacunación con ADN; de hecho, también suelen sintetizar, procesar y hasta presentar el antígeno

implicado, vía moléculas de MHC-I, a los linfocitos T CD8+. Sin embargo, dado que no expresan moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), lo más probable es que llevan al linfocito T a un estado de anergia, a menos de que dichas moléculas sean aportadas por APCs derivadas del proceso inflamatorio (121, 137).

El miocito parece representar una célula clave en la inducción de la respuesta inmune; no obstante, estudios realizados con fragmentos de músculo esquelético –extirpados inmediatamente después de ser inoculados con la vacuna de ADN–, demuestran que en ellos no ocurre un incremento de la respuesta inmune; como consecuencia, a estas células se les considera únicamente como “fábricas de antígenos” encargadas de suministrar su producto a las APCs migratorias presentes en el músculo, todo ello después de ser sometidos al proceso de lisis celular por parte de los CTLs, lo que adicionalmente libera al plásmido (113, 187).

Presentación antigénica a los linfocitos T por parte de las APCs

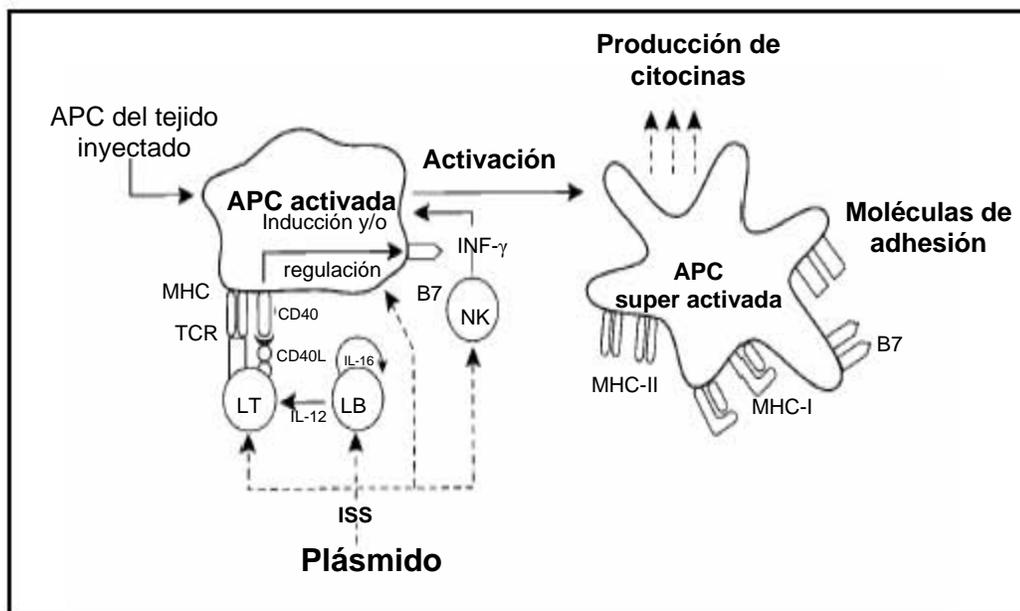
Este mecanismo incluye la transfección directa de las APCs, las cuales pueden expresar, procesar y presentar el antígeno vía el MHC-I o II a los linfocitos T CD8+ o CD4+, respectivamente; su migración a los nódulos linfáticos locales inicia la respuesta inmune (122, 149).

En general, la transfección directa de DCs desencadena una respuesta inmune que no se observa en macrófagos, lo que sugiere que, entre las APCs, las DCs figuran como la estirpe celular que interviene predominantemente en la respuesta inmune generada por las vacunas de ADN (113, 187).

Lógicamente, la capacidad de las DCs para inducir una inmunidad específica depende de su grado de maduración, el cual implica una serie de cambios fenotípicos y funcionales (consultar la figura 16), destacando entre ellos: el aumento de la expresión de moléculas de MHC y coestimuladoras; cambios morfológicos tales como el incremento de su región superficial; la secreción de quimiocinas y citocinas, cuya función consiste en atraer y/o permitir la proliferación de linfocitos T; la producción de proteasas encargadas de activar proteínas funcionales; y la expresión de moléculas de adhesión y de receptores para quimiocinas al nivel superficial (103).

En este contexto, se ha señalado que el uso de adyuvantes que logren favorecer la maduración, activación o reclutamiento de las DCs a la zona de inoculación, permitiría incrementar la potencia de las vacunas de ADN. Por ello, actualmente se ensaya introduciendo a los plásmidos algunos genes que codifican para factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas o diversos productos virales, con los cuales se logra mejorar el funcionamiento de las DCs y, desde luego, aumentar la eficacia de las vacunas de ADN (103, 188).

Figura 16. Activación de las APC en la vacunación con ADN (112).

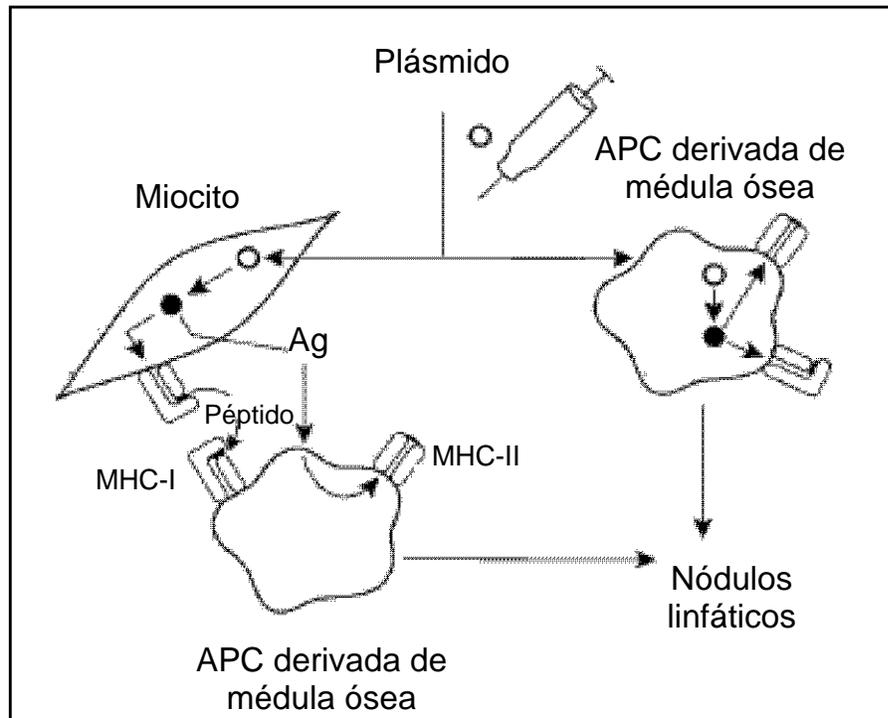


Presentación cruzada (*cross priming*)

En virtud de que las células somáticas son las que se transfectan en mayor proporción en una vacunación con ADN, hasta ahora se les considera las responsables de suministrar el antígeno; éste es secretado hacia los espacios intersticiales. Cabe señalar que la inserción de genes que codifiquen una secuencia “señal” dentro del plásmidos, provoca que el antígeno sea secretado a los espacios intersticiales, sin que la célula hospedera sea destruida. Sin embargo, se piensa que la expresión del antígeno puede desencadenar una señal de “peligro”, que genere la apoptosis de la célula hospedera por CTLs, liberando el antígeno, el cual puede ser endocitado por

las DCs presentes en la región, lo que originaría la respuesta inmune (consultar figura 17) (65, 137).

Figura 17. Presentación cruzada de las vacunas de ADN (112).



Diversos experimentos confirman que los plásmidos abandonan el sitio de inoculación, durante las primeras 5 h, por lo tanto, las células transfectadas deben ser migratorias, tales como: células de Langerhans o linfocitos circulantes. En conclusión, las células no migratorias (miocitos o queratinocitos) influyen en la magnitud de la respuesta inmune, pero la inmunidad es inducida por células migratorias (APCs), ya sea por una transfección directa o por endocitosis del antígeno secretado (187).

Factores que modifican la respuesta inmune en las vacunas de ADN

Después de comprender los mecanismos implicados en la respuesta inmune en las vacunas de ADN, es importante considerar algunos factores que determinan su tipo y magnitud, los cuales se resumen en la tabla 7 (112, 116, 167,182).

Tabla 7. Factores que influyen en la inmunogenicidad de las vacunas de ADN (112).

Factores	Observaciones
Estructura del plásmido	Presencia de elementos de regulación de la expresión génica.
Cantidad de plásmido liberado	Mayor cantidad de plásmido liberado dentro de las células genera una mejor respuesta inmune.
Nivel de expresión del antígeno	Mayor expresión del antígeno se relaciona con una fuerte respuesta inmune, aunque no de forma proporcional.
Esquema de inmunización	La respuesta inmune puede ser reforzada efectivamente.
Vía de administración	Epidérmica, i.m., i.d., nasal, entre otras.
Tejido "blanco"	Piel, músculo esquelético o mucosas.
Presencia o ausencia de intrones	La presencia de intrones aumenta la eficacia de las vacunas.
Especies animales	Diferentes cepas de ratón muestran diferencias cualitativas y cuantitativas en la respuesta inmune inducida.
Edad de los animales	Fuerte respuesta inmune en ratones jóvenes.
Toxicidad del antígeno	Alta expresión no es deseable con antígenos tóxicos.

ix. Esquemas de inmunización

En general, los esquemas de vacunación contemplan la posibilidad de aportar una suficiente cantidad de antígeno al sistema inmune, aunque sin exceder la dosis apropiada, a fin de evitar fenómenos de tolerancia inmunológica, ya que varios refuerzos, provocarían que el organismo comience a reconocer a los antígenos como propios y no desencadene ninguna respuesta inmune. En este sentido, pueden ser necesarias varias inmunizaciones para incrementar la respuesta inmune de las vacunas de ADN, como lo muestra el hecho de que sólo después de cuatro inmunizaciones, se incrementan los niveles de anticuerpos y CTLs (116, 149, 167).

Un nuevo esquema, denominado de “inducción y refuerzo” (*prime-boost*), está basado en la combinación de dos formas de inmunización y en la liberación de antígeno a diferentes intervalos de tiempo; en concreto, se utilizan un vector sencillo para la etapa de inducción de la respuesta inmune y un vector más complejo para reforzarla. El método incluye protocolos que combinan las vacunaciones con ADN y con otra clase de productos, lo que se asocia a una elevada eficacia que podría deberse a la capacidad para generar linfocitos T de alta afinidad, cuya cantidad aumenta durante la etapa de refuerzo (45, 65, 113, 116, 154, 167).

Un ejemplo de este tipo de esquemas incide en los estudios de protección contra la tuberculosis (TB), en los que se utiliza la vacuna de ADN durante la

fase de inducción de la respuesta inmune y la BCG en la fase de refuerzo (147, 148).

Por otra parte, se ha observado que la administración de vacunas de ADN en múltiples sitios del mismo individuo incrementaría la distribución antigénica y la reactividad, empleando bajas dosis del inmunógeno; los trabajos realizados en ratones demuestran un notable aumento de la respuesta inmune humoral y celular, aunque su eficacia depende del rendimiento de la transfección, del número de APCs saturadas con el antígeno y del reclutamiento de linfocitos T *naive* en los nódulos linfáticos locales (63).

x. Adyuvantes

Una vacuna de ADN considerada “ideal” debe ser simple y estable, resistir la degradación enzimática, permitir un efecto de depósito para su liberación lenta durante días o semanas, facilitar la endocitosis del ADN por parte de las células especializadas en iniciar la respuesta inmune y, sólo si es estrictamente necesario, incluir adyuvantes (5, 113, 129, 149, 165).

Los adyuvantes⁷ son sustancias que se incorporan al antígeno o se inyectan junto con él, a fin de potenciar la respuesta inmune; uno de sus mecanismos

⁷ Adyuvante: del latín *adjuvare*, que significa ayudar.

de acción incluye precisamente la promoción del efecto de depósito, el cual favorece un reservorio antigénico de duración prolongada y estimula la formación de granulomas, cuyos principales componentes son los macrófagos y que representan importantes nichos para la interacción del antígeno con las principales células del sistema inmune (88, 167).

Tradicionalmente, la función de un adyuvante era la de establecer una respuesta inmune vasta y duradera; sin embargo, actualmente se emplean para inducir una mejor actividad biológica, caracterizada no sólo por anticuerpos de diferente especificidad, título, duración, memoria, clase e isotipo, sino por una sólida inmunidad celular (CMI) y, adicionalmente, se busca que aporten la posibilidad de usar distintas vías de administración, de reducir la dosis del inmunógeno, de incrementar la estabilidad de la formulación y de que el esquema de inmunización pueda modificarse (6, 27, 174).

La tabla 8 señala el nombre de algunos adyuvantes utilizados en las vacunas de ADN.

Tabla 8. Adyuvantes utilizados en la vacunación con ADN (174).

Categoría	Clasificación	Nombre
Adyuvantes genéticos	Moléculas coestimuladoras	CD80 CD86 CD154 (CD40L)
	Citocinas	IL-1 IL-2
	Quimiocinas	TCA-3 RANTES
	Proteínas de fusión	Hsp70 Exotoxinas Fas Caspasas
Adyuvantes convencionales	Sales minerales	Al(PO ₄) ₃ Al(OH) ₃
	Derivados de bacterias	MPL Toxina del cólera
	Derivados de lípidos	Liposomas catiónicos
	Emulsiones	QS-21

a) Adyuvantes genéticos

Este tipo de adyuvantes incluye genes insertados en los plásmidos de ADN, los cuales codifican para moléculas que pueden incrementar o modificar la respuesta inmune. Entre dichas moléculas se cuentan las siguientes (109):

- **Citocinas**

Son proteínas con una vida media corta, que pueden incrementar o modular la respuesta inmune; aunque su elección podría depender del mecanismo de acción de cada una, generalmente se seleccionan en forma empírica (81, 116, 122, 185).

Por ejemplo, la utilización de IL-2 en las vacunas de ADN induce la proliferación y diferenciación de las células NK y de los linfocitos T y B; por su parte, la IL-12 y el INF- γ incrementan la respuesta Th1, así como la actividad de los CTLs, lo que resulta contrario al efecto de la IL-4, la cual incrementa la respuesta Th2 (113, 116).

Análogamente, el GM-CSF atrae DCs a la zona de inoculación y favorece su maduración; así mismo, la IL-10 y el TGF- β disminuyen la proliferación de linfocitos T, por lo que se aplican para reducir la respuesta inmune ligada a las enfermedades autoinmunes. Otros ejemplos se mencionan en la tabla 9 (65, 81, 122).

Tabla 9. Efecto de la administración de citocinas en la vacunación ADN (116).

Citocinas	Anticuerpos	Respuesta Celular	CTL
IL-1	↑ IgG ↑ IgG2a	↑ CTL ↑ IFN-γ	↑ Proliferación
IL-2	↑ IgG ↑ IgG2a ↑ IgG1*	↑ Proliferación ↑ IFN-γ	↑ CTL
IL-4	↑ IgG1 ↑ IgG	↑ Proliferación ↓ DHT	No hay aumento
IL-5	↑ IgG	± Proliferación	No hay aumento
IL-7	↑ IgG2a ↑ IgG1	↑ IFN-γ	
IL-8		↑ Neutrófilos	
IL-10	↑ IgG ↓ IgG2a ↓ IgG1*	↓ DHT ↓ Proliferación ↓ IFN-γ ↓ TNF-α ↓ actividad de Neutrófilos	
IL-12	↑ IgG2a ↑ o ↓ IgG1* ↑ o ↓ IgG*		
IL-15	↑ IgG*	± ↑ Proliferación	↑ CTL
IL-18	↑ IgG	↑ Proliferación	↑ CTL
TNF-α y β	↑ IgG	↑ Proliferación	↑ CTL
GM-CSF	↑ IgG ↑ IgG2a e IgG1*	↑ Proliferación	↑ CTL ↑ IFN-γ

* Los estudios no coinciden

DHT= hipersensibilidad de tipo retardada, ↑= aumento

Tabla 9. Efecto de la administración de citocinas en la vacunación ADN (continuación).

Citocinas	Anticuerpos	Respuesta Celular	CTL
TGF- β	No hay cambio en IgG o IgG2a \uparrow IgG1	\downarrow DHT \downarrow Proliferación \downarrow IL-4 \downarrow IL-5 \downarrow IFN- γ \uparrow IL-10 \downarrow TNF- α	
IFN- γ	\uparrow IgG2a \uparrow o \downarrow IgG1*	\uparrow o \downarrow Proliferación \uparrow IFN- γ \downarrow IL-5 \downarrow Eosinófilos	\uparrow CTL
IFN- α y β		Reducen la replicación viral y la carga tumoral	

* Los estudios no coinciden
DHT= hipersensibilidad de tipo retardada, \uparrow = aumento

- **Quimiocinas**

Las quimiocinas corresponden a un tipo de citocinas que estimulan la movilidad de los leucocitos y regulan su migración desde la sangre hacia los tejidos. En este sentido, la administración de la MIP-1 α en las vacunas de ADN propicia el reclutamiento de DCs inmaduras, lo que incrementa transitoriamente la inmunogenicidad; evidentemente, junto con el GM-CSF se obtiene una mejor respuesta (103, 116, 188).

La quimiocina RANTES ha despertado un gran interés, debido principalmente a su extraordinaria capacidad para atraer monocitos, linfocitos T de memoria, células NK y eosinófilos al sitio de inoculación; induce respuestas Th1 y de CTLs, impulsa la producción de moléculas coestimuladoras y propicia una mayor inmunidad en membranas mucosas. La tabla 10 incluye otros ejemplos interesantes (57, 87, 146).

Tabla 10. Efecto de la administración de quimiocinas en la vacunación ADN (116).

Adyuvante	Anticuerpos	Respuesta Celular	CTL
IL-8	↑ IgG ↑ IgG2a	↑ Proliferación ↑ IL-2 ↑ IFN-γ	
MIP-2	↓ IgG2a ↑ IgG ↑ IgG1*	↑ IFN-γ	↑ CTL
RANTES	↑ IgG* ↑ IgG2a	↑ Proliferación ↑ IL-2 e IL-4 ↑ IFN-γ ↑ Quimiocinas	↑ CTL
MIP-1α	↑ IgG ↑ IgG2a* ↑ IgG1*	↑ Proliferación ↑ IL-2 e IL-4	↑ CTL
MIP-1β	↑ IgG	↑ Proliferación ↑ IL-2 e IL-4	No hay aumento

* Los estudios no coinciden
↑= aumento

- **Moléculas coestimuladoras**

Las moléculas coestimuladoras promueven la activación de los linfocitos T e incrementan la capacidad funcional de las APCs, características que las hacen particularmente interesantes. Las más utilizadas en las vacunas de ADN son la CD80 y la CD86, si bien la inyección de CD154 (“ligando” para CD40 expresado transitoriamente por linfocitos T activados) aumenta la respuesta humoral y celular. La tabla 11 señala varios ejemplos (112, 116).

Tabla 11. Efecto de la administración de moléculas coestimuladoras y de adhesión en la vacunación ADN (116).

Adyuvante	Anticuerpos	Respuesta Celular	CTL
B7-1 (CD80)			↑ CTL*
B7-2 (CD86)		↑ DHT ↑ Proliferación	↑ CTL*
CD40L	↑ IgG2a ↑ IgG ↑ IgG1*	↑ IFN-γ	↑ CTL
ICAM-1 (CD54)		↑ Proliferación ↑ IFN-γ ↑ Quimiocinas	↑ CTL
CTLA-4	↑ IgG ↓ IgG2a > IgG1	↑ Proliferación	

* Los estudios no coinciden
DHT= hipersensibilidad de tipo retardada, ↑= aumento

- **Proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión representan el producto de la unión de dos genes dentro del plásmido, uno que codifica para el antígeno de interés y otro para una proteína, cuya función es proporcionar señales de secreción o de localización celular, que permitan incrementar la expresión del gen de interés –sin modificar su estabilidad o función– y, con ello, inducir una mejor respuesta inmune (64, 65, 116, 165).

Por ejemplo, la ubiquitina acelera la degradación del antígeno por parte de los proteosomas y mejora la presentación de los péptidos implicados vía el MHC-I; la fusión de los genes que codifican para antígenos de *Mycoplasma pulmonis* y para ubiquitina, respectivamente, estimulan altos niveles de protección, aunque no siempre se incrementa la respuesta celular (93, 154,185).

De manera similar, la fusión de los genes que codifican para las proteínas CTLA-4 y L-selectina promueve incrementos en la respuesta humoral, debido posiblemente a que el antígeno se expresa dentro de las APCs, lo que mejora el proceso de inmunización. Otros ejemplos se mencionan a continuación (49, 52, 154, 185):

a. Proteínas de choque térmico (hsp)

Las proteínas de choque térmico desencadenan una respuesta destinada fundamentalmente a lograr la supervivencia de las células, que han sido expuestas a incrementos repentinos de temperatura o a condiciones de estrés. Este mecanismo previene la desnaturalización de otras proteínas y, por lo que respecta a su función en las vacunas de ADN, diversos experimentos realizados en ratones inoculados con plásmidos que codifican simultáneamente para el antígeno de interés unido a hsp, han demostrado que la combinación estimula aún más la respuesta inmune (6, 142).

b. Exotoxinas

Las exotoxinas bacterianas han sido analizadas en cuanto a su posible efecto adyuvante en mucosas, destacando en los trabajos implicados el empleo de la subunidad B de la toxina del cólera (CT) y la toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (87,150).

La CT y la LT incrementan la permeabilidad del epitelio intestinal y la presentación antigénica por parte de una gran variedad de tipos celulares; su desempeño aparenta ser muy interesante, ya que ambas persisten en las superficies mucosas por tiempos relativamente prolongados, promueven el cambio de isotipo de los linfocitos B, incrementando la concentración de anticuerpos IgA, al margen de que la LT es muy segura por vía cutánea en

humanos. En general, la liberación de plásmidos de ADN que codifican para el gen de la CT o de la LT ha mostrado efectos inmunoestimuladores (45, 87, 116,166).

Si bien el uso estas toxinas es polémico debido a sus efectos adversos, las estrategias actuales se enfocan en disminuir su toxicidad mediante técnicas de ingeniería genética, sin alterar su potencial como adyuvantes (167, 170).

c. Inductores de apoptosis

La apoptosis corresponde generalmente a un proceso de muerte celular programada, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria. En relación con la vacunación con ADN, la inserción de factores que inducen el fenómeno en las células hospederas transfectadas incrementa la respuesta inmune, habida cuenta que propicia la liberación del antígeno elaborado, el cual posteriormente puede ser fagocitado, procesado y presentado por las APCs. En este caso, los experimentos realizados han incluido a los genes *fas*, inductores naturales de apoptosis, los cuales parecen incrementar la actividad de los CTLs (45, 103, 112).

Cabe señalar que otros trabajos sugieren lo contrario: el aumento en la eficacia de la vacunación con ADN cuando se previene la apoptosis en las APCs, lo cual resulta lógico. Sin embargo, la solución incidiría en los sitios de inoculación y acción: la inducción de la apoptosis sólo se buscaría en las

células somáticas, para facilitar la liberación del antígeno, cuidando que el proceso se inhiba en las APCs, a fin de preservar la presentación antigénica a los linfocitos T (45, 64).

b) Adyuvantes convencionales

Los adyuvantes “convencionales” corresponden en buena parte a compuestos químicos que incrementan o prolongan la respuesta inmune asociada a las vacunas de ADN, figurando los mencionados a continuación:

Geles de hidróxido de Aluminio

Estos adyuvantes son los únicos aprobados para su uso en humanos, su mecanismo de acción se basa en una liberación lenta del antígeno durante periodos prolongados, lo que activa a linfocitos y macrófagos (28).

Referente a las vacunas de ADN, se ha demostrado en modelos animales que estos adyuvantes aumentan la inmunogenicidad, estimulando respuestas Th2, sintetizando IL-4 e IL-5 y dando origen a anticuerpos IgG1 e IgGE, aunque su actividad depende de una adecuada interacción electrostática entre el ADN y el adyuvante (49, 88, 174).

Lípido A monofosforilado (MPL)

Los microorganismos presentan moléculas de superficie y factores solubles que funcionan como adyuvantes, estimulando al sistema inmune e induciendo procesos inflamatorios. En tal contexto, la potencia de las vacunas de ADN puede ser aumentada simulando estas señales, vía la incorporación de adyuvantes sintéticos tales como el QS-21 o el lípido A monofosforilado (MPL) (113).

El lípido A monofosforilado (MPL) es un componente activo del LPS de *Salmonella minnesota*, el cual se ha observado que incrementa la respuesta humoral asociada a la vacunación con ADN por las vías i.m. o i.d.. El mecanismo de acción aún no se ha logrado dilucidar, pero incluye la interacción con el TLR4 (Receptor tipo toll 4) y el CD14, lo que provoca la activación de macrófagos y la producción de INF- γ , IL-1, IL-2, e IL-12, generando una respuesta Th1; no obstante, es importante tomar en cuenta que el empleo de MPL implica cierta degradación de ADN (116, 165, 170, 174).

Por su parte, el adyuvante QS-21 corresponde a una saponina aislada de la corteza del árbol *Quillaza saponaria* y prácticamente induce la misma respuesta inmune que el MPL. En efecto, incrementa los niveles de CTLs previa vacunación con ADN, aunque su mecanismo de acción permanece sin aclararse; al parecer, incluye la formación de poros en la membrana celular,

debida a la interacción con el colesterol, pero se desconoce si su efecto como adyuvante se deba a esta propiedad (44, 81, 165).

xi. Sistemas de liberación

La eficacia de las vacunas de ADN desnudo en modelos animales no ha podido reproducirse en seres humanos, debido principalmente a la limitada distribución del producto en los diversos tejidos y a que más del 90% de los plásmidos son degradados por macrófagos, antes de llegar a su núcleo, donde se llevaría a cabo la expresión de los genes (165).

Sin embargo, ante la pretensión de incrementar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN, también se está explorando la posibilidad de optimizar la liberación de los plásmidos, para su debida captación por parte de las células hospederas. Los sistemas de liberación se clasifican de la siguiente manera (22, 165, 174):

- Sistemas de liberación mecánicos, son los que incluyen a las inyecciones con agujas o presión y al bombardeo de partículas.
- Sistemas de liberación eléctricos, representados hasta ahora por la electroporación.

- Sistemas de liberación química, como los que involucran a los liposomas o a cualquier encapsulación del ADN en diversos polímeros.
- Sistemas de liberación mediante acarreadores bacterianos o virales.

A. Sistemas de liberación mecánicos

Los métodos físicos o mecánicos han sido utilizados efectivamente para facilitar la liberación de los plásmidos de ADN *in vivo*, destacando los que se señalan a continuación:

Inyección con agujas. Aunque este método es ampliamente utilizado para la administración de vacunas, presenta algunas desventajas, entre las cuales se cuentan su invasividad, ciertos problemas de seguridad asociados a la contaminación de la aguja, la ausencia de inmunidad en mucosas y las grandes cantidades de ADN que se requieren para inducir una vasta respuesta inmune (46, 61, 90, 113, 122).

Inyectores a presión. Estos dispositivos basan su aplicación en la administración de las vacunas a presión y sus ventajas incluyen una fácil administración, menor invasividad y dosis de antígeno –pues se distribuye

mejor el inóculo– y, dado que provocan una inflamación local en el sitio implicado, originan una mayor respuesta inmune (41, 116, 138).

Cabe señalar que el dispositivo que libera al antígeno en forma de spray dentro de la epidermis es conocido como “*Biojector*” (consultar figura 18), en él se pueden cargar varias dosis de la vacuna y ser aplicadas a diferentes personas, lo que hace que su administración sea más práctica y sencilla. En cuanto a su uso en las vacunas de ADN, se ha demostrado una gran eficacia en modelos animales, aunque el éxito depende del tipo de vacuna, del dispositivo de inyección y de la vía de administración, dosis, antígeno y esquema de inmunización (116, 138, 158).

Figura 18. Biojector 2000 (138).



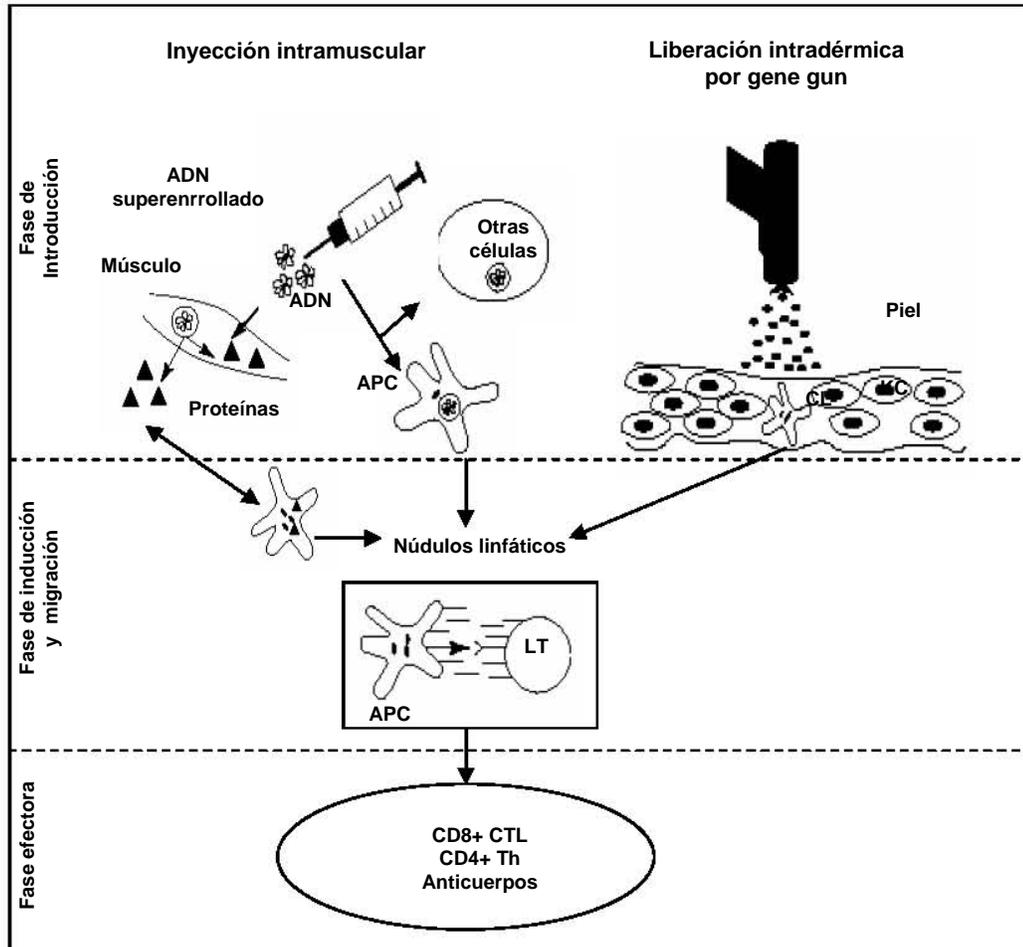
Bombardeo de partículas. El sistema de liberación epidérmica mediada por partículas (PMED), también denominado bombardeo o aceleración de partículas (*gene gun*), es muy efectivo para la transfección de células, ya que se piensa que puede ubicar al plásmido directamente en el citoplasma de la célula y, probablemente, en el núcleo. Aunque, quizás sea más difícil pensar que los plásmidos pudieran acceder directamente al núcleo, se debe tomar en cuenta las características del sistema de liberación y las propias de los plásmidos (45, 187).

La técnica consiste fundamentalmente en el acoplamiento de los plásmidos de ADN a algunas partículas de oro o tungsteno menores de 3 μm de diámetro; el complejo resultante es administrado por medio de una pistola de helio comprimido a alta presión, lo que favorece su liberación a nivel intracelular en miocitos, queratinocitos y células de Langerhans. Al parecer, el estrés ocasionado por el impacto de la administración, contribuye a la activación y proliferación de DCs en la piel, así como a la posterior migración de estas células hacia los nódulos linfáticos. Sin embargo, cabe subrayar que la respuesta inmune que se pretende desencadenar puede ser inducida sin las partículas de oro (45, 46, 81, 113, 115, 187).

Al realizarse comparaciones entre el bombardeo de partículas y la inyección con agujas se han establecido diversas diferencias; por ejemplo, la inyección por vía i.m. o i.d. requiere de grandes cantidades de plásmido (50-100 μg por vía i.m.) para obtener una respuesta inmune de Th1; por su parte, el

bombardeo de partículas necesita cantidades de plásmido menores a los 10 µg e induce una respuesta equilibrada Th1/Th2, con incremento en los niveles de IL-4 y disminución de INF-γ (consultar la figura 19) (28, 45, 52, 113, 182).

Figura 19. Sistemas de liberación en la vacunación de ADN (182).



Evidentemente, esta clase de patrones no siempre se reproduce, debido principalmente a la naturaleza del antígeno, al régimen de inmunización, al tipo de células transfectadas y a la concentración de las citocinas involucradas (116, 187).

B. Sistemas de liberación eléctricos

Electroporación

La electroporación consiste en la aplicación controlada de pulsos eléctricos, los cuales aumentan transitoriamente la permeabilidad de la membrana celular y nuclear; ello facilita la entrada de los plásmidos a las células hospederas, incrementando los niveles de expresión del antígeno y, por lo tanto, la respuesta inmune asociada a la vacunación con ADN (129, 165, 169).

Las principales ventajas de esta técnica incluyen su bajo costo y fácil administración; el dispositivo utilizado se muestra en la figura 20 y consta de un electrodo provisto de pequeñas agujas (129).

Figura 20. Dispositivo utilizado en la electroporación por vía intradérmica (169).

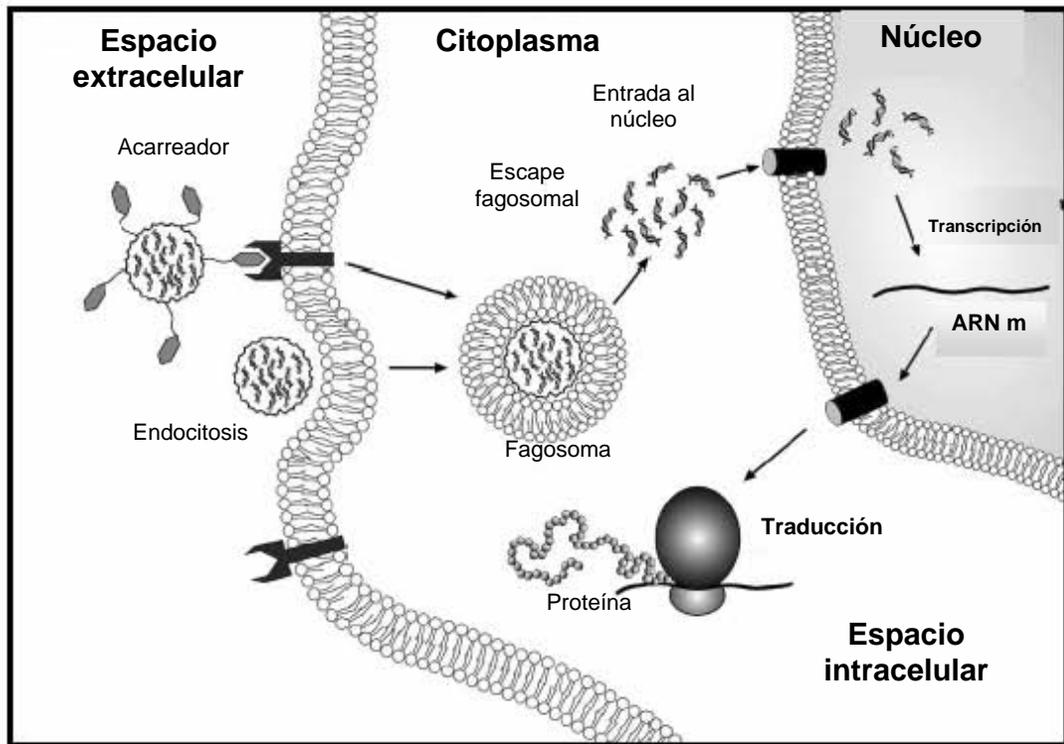


Si bien los factores que influyen en el incremento de la respuesta inmune aún no se han comprendido plenamente, es muy posible que incluyan a la distribución del ADN en los tejidos y a la respuesta inflamatoria que se genera en el sitio de inoculación. Sin embargo, se ha sugerido que el uso de la electroporación también puede impulsar la integración del plásmido al genoma del hospedero, lo que impediría o limitaría su uso en cuanto a futuras aplicaciones terapéuticas; a tal respecto, algunos autores proponen que las condiciones óptimas en cuanto a la amplitud del campo eléctrico, número, duración e intervalo de los pulsos eléctricos minimizaría el problema (78, 116, 169).

C. Sistemas de liberación química

Este tipo de sistemas de liberación implica el empleo de polímeros biodegradables, liposomas y virosomas, los cuales pueden inactivar enzimas lisosomales o desequilibrar la membrana fagolisosomal, lo que permite mejorar la liberación intracelular, proteger de la degradación enzimática y, en algunos casos, promover la liberación controlada del antígeno (consultar la figura 21) (22, 156).

Figura 21. Plásmidos de ADN liberados mediante acarreadores químicos (22).



Polímeros biodegradables

Los polímeros utilizados como sistemas de liberación de las vacunas de ADN deben ser catiónicos, inertes, biodegradables, biocompatibles y de baja toxicidad, además de poder encapsular a dicho ácido nucleico, formar complejos con él o adsorberlo, todo ello mediante interacciones electrostáticas. Entre los polímeros más utilizados en los estudios sobre vacunación con ADN figuran los siguientes (22, 116):

Polietilamina (PEI). Ésta presenta una alta densidad de cargas catiónicas, lo que le permite encapsular el ADN; una vez administrada, se une a “ligandos” localizados en la membrana celular, lo que origina una eficiente liberación de genes y, por ende, elevados títulos de anticuerpos (3, 22, 49).

Chitosan. Los polímeros catiónicos de chitosan pueden ser formulados en diferentes tamaños (20 a 500 nm) y presentan propiedades mucoadhesivas. Después de la administración oral de plásmidos de ADN –que codifican para alérgenos alimenticios– acomplexados con polímeros de chitosan se observa, tanto la expresión de los genes implicados en el epitelio intestinal de ratones, como la producción de anticuerpos IgA e IgG2a; además, se controla la cantidad de anticuerpos IgE y, con ello, la anafilaxia (44, 105, 170, 192).

Poli(láctico-co-glicólico) (PLG). La encapsulación de los plásmidos de ADN en micropartículas de PLG ha sido ampliamente estudiada, ya que se asocia a una liberación lenta, al incremento de la eficacia de transfección, a la protección del ADN en relación con la degradación enzimática y a una intensa respuesta inmunológica. El mecanismo de acción correspondiente incluye un aumento de pH que inactiva a las enzimas lisosomales o desestabiliza a la membrana fagolisosomal, lo que finalmente favorece la liberación del ADN dentro del citoplasma (82, 92, 95, 96, 116).

Las micropartículas de PLG parecen inducir la activación de macrófagos, la secreción de citocinas y la estimulación de una alta expresión de CD86 en

APCs activadas. Adicionalmente, administradas por vía oral protegen al ADN del ambiente digestivo del tracto intestinal, estimulan una inmunidad sistémica (IgG), e inclusive, pequeñas cantidades pueden ser absorbidas por las células M, lo que desencadena una respuesta inmune en mucosas (IgA) contra el antígeno codificado (92, 95, 124,182).

Las ventajas de este método incluyen su liberación pulsátil, que puede imitar a las inyecciones de refuerzo, y su actividad adyuvante intrínseca –basada en un tamaño uniforme de 0.5-5 μm –, que permite la fagocitosis de las partículas por parte de las DCs y estimula una respuesta inmune humoral y celular (26, 95, 97).

Entre sus ventajas destacan: a) la baja biodisponibilidad del ADN, debida a la velocidad de difusión; b) una liberación pulsátil, que puede inducir tolerancia al antígeno; c) el microambiente de bajo pH, que se crea dentro de las micropartículas –durante la degradación *in vivo*– puede afectar la actividad de los plásmidos; d) los disolventes orgánicos utilizados durante su producción, pueden desnaturalizar proteínas; e) la esterilización con rayos γ de las microesferas –fundamental para su uso en humanos– llega a degradar parcialmente al polímero; f) existe la posibilidad de que ocurra alguna respuesta alérgica, ya sea después de la inyección o en cada pulso de liberación (39, 95).

Liposomas

Los liposomas son lípidos en forma de vesículas que actúan como vacuolas de depósito dentro del macrófago, las cuales proporcionan la cantidad adecuada de inmunógeno. En las vacunas de ADN, la carga negativa del ácido nucleico es aprovechada para facilitar su interacción electrostática con liposomas catiónicos, lo que de manera secundaria modifica la carga y el tamaño del plásmido (22, 81, 165, 185).

Después de haberse administrado la vacuna, se forma un complejo entre el liposoma y la membrana plasmática de la célula hospedera, el cual permite la liberación del ADN; posteriormente, éste se adhiere a vesículas aniónicas intracelulares. El mecanismo propuesto incrementa el número de células transfectadas (122, 165, 185).

Este sistema de liberación protege de la degradación extracelular al plásmido involucrado –en las mucosas–, garantiza su contacto con el tejido celular “blanco” e incrementa el número de plásmidos que se liberan de los fagosomas y entran intactos al núcleo. En general, el uso de liposomas en la liberación de vacunas de ADN ha demostrado ser muy efectivo; por ejemplo, en el músculo esquelético, la Vaxfectina^{MR} (formulación lipídica catiónica) incrementa la respuesta humoral sin disminuir la de CTLs (22, 59, 81, 165, 174).

Virosomas

Los virosomas se constituyen por liposomas que contienen proteínas virales incrustadas; ello les permite fusionarse con células del sistema inmune y liberar hacia ellas los plásmidos implicados, antes de ser degradados y sin generar problemas de toxicidad. Su uso en las vacunas de ADN incrementa el número de células transfectadas y la expresión de los genes codificados, si bien su efectividad depende de la proteína fusionada (30, 42, 59, 72).

D. Sistemas de liberación con acarreadores bacterianos o virales

Bacterias atenuadas

Este sistema de liberación se basa en la inoculación de una bacteria atenuada (consultar la tabla 13), que contiene el plásmido que codifica para el antígeno de interés y, al ser fagocitada por los macrófagos o DCs, puede liberar el plásmido dentro de la célula hospedera (48, 177).

Cabe señalar que dependiendo del lugar donde ocurra la liberación del plásmido dentro de la célula hospedera, se observa la siguiente clasificación:

a) intracelulares: *Escherichia coli* o *Yersenia sp*, b) intrafagosomales:

Salmonella sp, c) intracitosólicas: *Listeria monocytogenes* o *Shigella sp* (43, 182).

Tabla 13. Bacterias atenuadas utilizadas como sistemas de liberación en las vacunas de ADN (177).

Transportadores	Cepa	Atenuación
<i>E. coli</i> K12	TG1 DHT10b	-- --
<i>Y. enterocolítica</i>	O:3, O:9	pYV ⁻
<i>S. typhimurium</i>	SL7207 RE88 SL7237	<i>aroA</i> <i>aroA</i> <i>aroA</i>
<i>S. Typha</i>	CVD 908- <i>htr A</i> Ty21a	<i>aroC</i> , <i>aroD</i> <i>galE</i>
<i>S. choleraesuis</i>		
<i>S. flexneri</i> 2 ^a	CVD1203 CVD1204	<i>aroA</i> <i>guaBA</i>
<i>L. monocytogenes</i>	Δ2	<i>mpl</i> , <i>act</i> , <i>pIB</i>

De acuerdo a lo anterior, la bacteria puede escapar del fagosoma –patógenos intracitosólicos– o al liberar el plásmido dentro del mismo –patógenos intrafagosomales–; posteriormente, en ambos casos se presenta la entrada en el núcleo de los plásmidos y la expresión del antígeno, el cual puede ser secretado, o bien, procesado y presentado a linfocitos T. Otra opción, es la apoptosis de las células transfectadas, lo que liberaría el plásmido, que al ser

endocitado por otras células, iniciaría la respuesta inmune (116, 118, 126, 177).

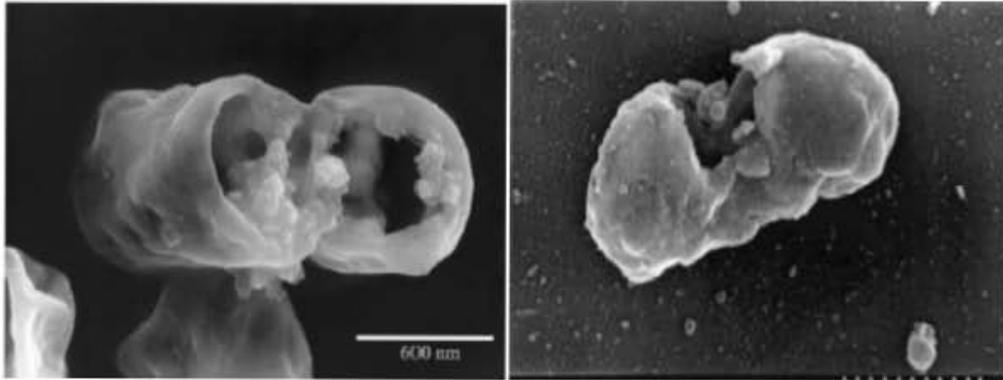
En especial, las cepas atenuadas de *Shigella flexneri* han sido utilizadas como sistemas de liberación exitosos de las vacunas de ADN, debido a que se replican dentro del intestino, estimulan inmunidad en mucosas y pueden ser administradas por vía oral. (81, 126, 152).

Entre las ventajas asociadas con estos sistemas de liberación destacan: su fácil administración y manufactura a gran escala, bajo costo de producción, capacidad de estimular una inmunidad en mucosas y, ser controladas mediante antibióticos (7, 130, 181).

Bacterial ghost (“fantasmas” bacterianos)

Bacterial ghost (BG) es el nombre que se ha venido manejando para aludir a la envoltura celular no desnaturalizada de las bacterias Gram negativas; dicho producto se obtiene mediante la lisis de la proteína E –molécula capaz de fusionar al interior con el exterior de la membrana–, lo que conduce a la formación de un túnel a través del cual es expelido el contenido citoplasmático, permaneciendo intacto el lumen interno y externo de la bacteria, aunque sin ácidos nucleicos, ribosomas u otros constituyentes (consultar la figura 21) (7, 18, 128).

Figura 21. Micrografía electrónica de BG de *E. coli* (7, 91).



El fantasma bacteriano puede utilizarse como vacuna, debido a sus propiedades adyuvantes sustentadas en la presencia del LPS, del lípido A y de los peptidoglicanos; el LPS no limita su uso, ya que al encontrarse asociado a las células se reduce su toxicidad al mínimo. Por otra parte, su papel como sistema de liberación de vacunas de ADN se asocia a una efectiva transfección de las APCs, a la activación de DCs, a la inducción de una respuesta inmune humoral y celular, a eficaces administraciones por vía oral o i.n., y a seguridad y fácil manipulación (7, 18, 91).

Virus

En este caso, el gen que codifica para la proteína antigénica se integra al genoma viral, el cual previamente es modificado genéticamente para garantizar la seguridad de la vacuna; es decir, el virus construido debe ser capaz de infectar a las células, pero sin producir la enfermedad, lo que resulta

en una amplia estimulación de la respuesta inmune contra el antígeno. El virus más utilizado es el de la viruela del canario (*canarypox*), aunque también se ha probado al virus de la rabia y al de la polio, así como a algunos adenovirus, entre otros (22, 152).

Es importante señalar que los antígenos están codificados por genes integrados a los genomas virales, por lo que estos productos se consideran más como vehículos que como sistemas de liberación. Por otra parte, su principal desventaja reside en los problemas de seguridad asociados, que pueden originar respuestas inflamatorias severas (129).

xii. Ventajas de la vacunación con ADN

Las vacunas de ADN presentan diversas ventajas sobre las vacunas convencionales, destacando las siguientes:

- Las vacunas de ADN desnudo son seguras y efectivas en cuanto a la generación de la respuesta inmune en modelos animales (52).
- La persona inmunizada actúa como “bio-reactor”, es decir, produce al antígeno *in vivo*, en forma pura y con la conformación antigénica ideal para estimular al sistema inmune (10).

- Las vacunas de ADN estimulan una respuesta inmune humoral y celular, e inclusive, presentan propiedades adyuvantes debido a los motivos CpG presentes en el plásmido (52).
- Dependiendo del sistema de liberación y/o del adyuvante, pueden inducir una vasta inmunidad en mucosas.
- A diferencia de las vacunas atenuadas, eliminan el problema de reversión de la virulencia; por tal razón, pueden ser utilizadas en individuos inmunocomprometidos.
- La liberación pulsátil del antígeno, lograda mediante la utilización de polímeros biodegradables, bien puede eliminar la necesidad de aplicar dosis de refuerzo.
- Los plásmidos de ADN pueden ser construidos como sistemas multivalentes contra uno o varios patógenos.
- Estas vacunas son producidas fácilmente, ya que el microorganismo donde se produce el plásmido es el mismo para diferentes vacunas, por lo tanto, el medio de cultivo es idéntico, además, no se requieren costosos o complicados procedimientos de purificación; se pueden

producir vacunas contra microorganismos difíciles de cultivar en el laboratorio y su almacenamiento es sencillo (52, 74, 179).

- Las vacunas de ADN dejan atrás el problema de desarrollar tolerancia neonatal, ya que pueden inducir una efectiva respuesta inmune en neonatos, aún en presencia de anticuerpos maternos; bajo estas circunstancias, las vacunas convencionales generalmente presentan interferencias en la inducción de la respuesta inmune (11, 121, 137,184).
- Diversos estudios preclínicos demuestran que las vacunas de ADN son toleradas; además, los ensayos clínicos actuales toman en cuenta especificaciones rigurosas que garantizan su eficacia y seguridad (167).

xiii. Desventajas de la vacunación con ADN

Entre las desventajas de la vacunación con ADN sobresalen las siguientes:

- El ADN se podría insertar en el genoma del hospedero, lo que podría dar lugar a la activación de oncogenes o a la desactivación de genes

supresores de tumores, desencadenando cáncer e inestabilidad genómica. La integración del plásmido podría ocurrir de varias formas, pero el proceso más común se lleva a cabo al azar (80, 122, 182).

Si bien la probabilidad de integración del plásmido a los cromosomas del hospedero es baja, estimándose en un evento por cada millón de células, las diferentes modificaciones realizadas a la vacuna podrían incrementar esta probabilidad. Por ello, las agencias regulatorias recomiendan realizar estudios de integración que garanticen la seguridad de las vacunas de ADN; dichos estudios deben realizarse con cada modificación efectuada al plásmido original y en especial cualquiera que incluya la entrada de la molécula al núcleo (81, 184).

- Si el plásmido llegara a ubicarse en tejido gonadal, su eventual integración a las células germinales podría inducir defectos genéticos heredables; en tal sentido, es necesario efectuar estudios de toxicidad reproductiva (80, 168)
- La posibilidad de inducir anticuerpos contra los plásmidos de ADN podría inducir o acelerar el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico (LES). No obstante, según estudios realizados en ratones normales y otros predispuestos al desarrollo de enfermedades autoinmunes, los títulos de

autoanticuerpos resultan insuficientes para provocar trastornos ligados a autoinmunidad en los animales normales (122, 157).

Por obvio, no se descarta la posibilidad de que las vacunas de ADN, pudieran causar o empeorar una enfermedad autoinmune órgano-específica, vía alguna reacción cruzada con los propios antígenos codificados en el plásmido de ADN (184).

- Administradas por vía i.m., la respuesta humoral que generan es relativamente baja y se requieren grandes cantidades de ADN desnudo para inducir la respuesta inmune en humanos. Este problema puede ser minimizado incorporando adyuvantes y analizando diversos sistemas de liberación y regímenes de inmunización, acciones que incrementan la complejidad y el costo de cada vacuna (49, 149).
- Si en la estructura del plásmido se han insertado genes de resistencia a antibióticos, requeridos por motivos de manufactura, la expresión podría beneficiar a los microorganismos patógenos, generando consecuencias que deben ser consideradas (49).

xiv. Ensayos clínicos

La evaluación de cualquier vacuna en desarrollo implica la realización de ensayos clínicos en seres humanos, exclusivamente cuando antes se ha demostrado su factibilidad y carencia de peligrosidad en modelos animales; es importante señalar que los aspectos más importantes a ser evaluados son principalmente la seguridad e inmunogenicidad vacunales, considerando en todo momento estándares rigurosos de control de calidad, antes de ser comercializadas (140, 164).

En general, el objetivo fundamental de las agencias regulatorias consiste en garantizar que sean seguros los métodos, procesos e instalaciones utilizados en la manufactura de las vacunas. En este sentido, en diciembre de 1996, la FDA emitió un documento con los aspectos a tomarse en cuenta para el desarrollo de vacunas de ADN, iniciando con su manufactura y terminando con los ensayos clínicos. De igual manera, la OMS ha emitido documentos para garantizar la calidad, potencia y consistencia de las vacunas de ADN, todos los cuales pueden ser encontrados en la página de Internet: www.who.int/biologicals (153, 184).

Actualmente, existen patentes para cada uno de los componentes, sistemas de liberación, procesos de purificación, etc., empleados en la vacunación con ADN; sin embargo, ninguna de ellas ha obtenido su registro de venta en

humanos, e inclusive, la única para la cual existe como antecedente es la vacuna de ADN equina contra el virus del Nilo (2005) (9, 24, 49, 184).

Si bien para las vacunas denominadas “convencionales” se deben realizar estudios de toxicidad que garanticen su seguridad, en las de ADN también es preciso incluir estudios que permitan comprobar el desarrollo de anticuerpos y la tolerancia inmunológica contra el plásmido, así como la inexistencia de oncogénesis –como resultado de la expresión de los antígenos o de la integración del ADN vacunal al genoma del hospedero– y la adecuada distribución y persistencia de los plásmidos en los tejidos. Adicionalmente, cuando las vacunas sean aplicadas con fines terapéuticos, deben llevarse a cabo diversos estudios en los que se combinen con los medicamentos correspondientes (49, 122).

Evidentemente, antes de iniciarse los ensayos clínicos en humanos, la FDA debe identificar los problemas de seguridad y establecer si la información preclínica resulta suficiente. Dichos ensayos contemplan las siguientes etapas: estudios preclínicos, los cuales evalúan la seguridad, inmunogenicidad y eficacia del producto vacunal en modelos animales; fase I, en la que se valoran la seguridad e inmunogenicidad, pero en un número pequeño de personas; fase II, destinada a determinar la eficacia en un número mayor de voluntarios; fase III, en la que ocurre la comercialización de la vacuna; y fase IV, durante la que se localizan reacciones adversas poco comunes (49, 165).

Afortunadamente, las vacunas de ADN han progresado rápidamente y algunas de ellas ya se encuentran en ensayos clínicos fase I o II, abarcando diferentes enfermedades, tal como lo resume la tabla 14.

Tabla 14. Ensayos clínicos recientes en vacunas de ADN (185).

Gen	Formulación	Fase
Hepatitis B HBsAg CpG7909+Engerix-B®	Partículas de oro Oligo +HbsAg/alum	I I/II
HIV <i>nef, rev o tat</i> <i>gag</i> (inducción) y MVA (refuerzo) Genes del HIV	ADN desnudo NA ADN desnudo	I I I
Influenza Genes de la influenza	ADN desnudo	I
Malaria Genes de <i>P. falciparum</i> Genes de la malaria	ADN desnudo Partículas de oro	II I
Cáncer de senos B7-1	NA	I
Melanoma IL-2 + SEB Gp-100 MART-1 Gp-100 + GM-CSF	DOTIM/Chol NA NA Partículas de oro	II II I I
Linfoma no Hodgkin's CpG 7909	CpG oligo	I/II
Cáncer de Próstata PMSA	ADN desnudo	II
Carcinoma celular renal IL-2	DMRIE/DOPE	II

CLAVES: NA= información no disponible; Chol= colesterol; CpG 7909= oligonucleótido con una secuencia no metilada CpG; DOPE= dioleoilfosfatidiletanolamina; DOTIM= 1-[2-(9-(Z)-octadecenoiloxi)etil]-2-(8-(Z) heptadecenil)-3-(hidroxietil)imidazol cloruro; DMRIE= N-(1-(2,3-dimiristiloxipropil)-N,Ndimetil-(2-hidroxietil)amonio bromuro; gp-100= glicoproteína-100; MART-1= antígeno específico del melanoma reconocido por los linfocitos T 1; PMSA= antígeno membranal específico de la próstata; SEB= enterotoxina B de *Staphylococcus*.

xv. Aplicaciones

Aún cuando la finalidad tradicional de las vacunas ha incidido en la prevención de enfermedades infecciosas, las de ADN han añadido la posibilidad de cubrir funciones terapéuticas a su espectro de acción (152, 187).

Sin lugar a dudas, el elemento más relevante de las vacunas de ADN es precisamente el gen de interés, el cual codifica para la síntesis de alguna proteína antigénica, ya sea que se encuentre presente en la estructura superficial del agente patógeno o que sea excretada por este último al medio externo. Entre los agentes causales incluidos hasta ahora en los estudios correspondientes, destacan (93):

1. Virus: el de la inmunodeficiencia humana (HIV), herpes simplex (HSV), herpes bovino (BHV), citomegalovirus (CMV), ébola, hepatitis B (HBV), hepatitis C, influenza (flu), sarampión, rabia y rotavirus.
2. Bacterias: *Mycoplasma pulmonis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Salmonella sp*, *Rickettsia*, *Yersinia enterocolytica* y *Listeria monocytogenes*.
3. Parásitos: *Leishmania major*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium flaciparum*, *Schistosoma japonicum* y *Entamoeba histolytica*.

4. Otros: Alergía, cáncer y toxina tetánica.

A continuación, se describen brevemente algunos de los resultados más relevantes asociados a la vacunación con ADN.

Bacterias

Mycobacterium tuberculosis

Durante las infecciones por micobacterias, es necesario que el sistema inmune dé origen a una respuesta celular, para que el agente invasivo pueda ser erradicado; por tal motivo, en la vacunación con ADN, resulta particularmente importante que el antígeno se exprese en un sitio apropiado y que el producto vacunal se administre junto con moléculas coestimuladoras o sistemas multivalentes, e inclusive, que se tome en cuenta que la fase de refuerzo incorpore a la BCG (22, 147, 148).

Las vacunas de ADN contra la tuberculosis (TB) se han elaborado con base en los genes que codifican para el antígeno 85A (Ag85A) y para la proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65) de *Mycobacterium tuberculosis*, aunque también se analizan las respuestas de otras moléculas proteicas, tales como la ESAT-6, Mtb 8.4, una lipoproteína de 19 kDa y el Ag85B. Los resultados obtenidos son particularmente exitosos en el caso de las dos primeras y promisorios en los restantes (22, 65, 147).

Por ejemplo, en ratones, la inyección i.m. de 10 a 100 µg de una vacuna de ADN, que codifica para el Ag85A induce una fuerte respuesta celular, caracterizada por altos niveles de IL-2 e INF-γ y bajos niveles de IL-4 o IL-5. Por su parte, las vacunas de ADN que codifican para la proteína hsp65 –englobadas en liposomas– originan una inmunidad protectora similar a la alcanzada por la BCG (22, 147).

Por último, las vacunas de ADN anti-lepra que codifican para la hsp60 son efectivas en ratones, tanto a nivel profiláctico como terapéutico (22, 64).

Biodefensa

Las vacunas de ADN son producidas a gran escala en poco tiempo y, además, una misma puede brindar protección contra varios patógenos, cuando se trata del diseño de sistemas multivalentes, características que resultan particularmente útiles en esta aplicación (65).

Entre los patógenos considerados para el desarrollo de vacunas de ADN destinadas a la biodefensa se cuentan a encuentran *Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis*; en el primer caso, se ha utilizado a los antígenos V y F1, obteniéndose buenos niveles de protección. En cuanto al bacilo del ántrax, el inmunógeno de interés es la exotoxina correspondiente; como es sabido, ésta se compone por tres fracciones proteicas: el antígeno protector (AP), el factor letal (LF) y el factor responsable del edema (FE), todas las cuales deben estar

presentes para llevar a cabo su acción tóxica. A tal respecto, las vacunas de ADN han generado buenos resultados, cuando se seleccionan los genes que codifican para el AP o para el FL (29, 65).

Cabe señalar que las vacunas de ADN contra la peste y el ántrax, solo requieren estimular una respuesta inmune humoral, para neutralizar a las enfermedades implicadas; sin embargo, esta clase de respuesta no siempre resulta suficiente, tal como ocurre en la tularemia, ocasionada por la bacteria intracelular *Francisella tularensis*; en este caso, es indudable que la vacunación con ADN sería ideal para combatir la enfermedad, pero es obligado el conocimiento de los genes que codifican para proteínas antigénicas de este microorganismo (65, 106).

Parásitos

La variación antigénica representa un gran problema para el desarrollo de vacunas anti-parasitarias, debido a que los agentes etiológicos suelen presentar diferentes estadios durante su ciclo de vida. En tal contexto, es obvio que el diseño de las vacunas de ADN correspondientes, esté enfocado a lograr que el plásmido contenga genes de interés que codifiquen para antígenos existentes en todas las etapas de desarrollo del parásito (100, 167).

Las vacunas de ADN contra *Plasmodium falciparum* –en su estadio infeccioso– inducen una respuesta de CTLs e INF- γ en humanos, aunque ello sucede en ausencia de anticuerpos, debido probablemente a los bajos niveles de antígeno producidos por las células hospederas (73, 116, 178).

La tabla 15 señala algunos de los resultados más relevantes de las vacunas de ADN contra parásitos.

Tabla 15. Vacunación con ADN en parásitos (100).

Parásito	Hospedero	Antígeno	Vía de administración	Resultados
<i>Plasmodium yoelli</i>	Ratón	PyCSP, PyHEP17, PySSP2	i.m.	Elevada respuesta de CTLs
<i>P. yoelli</i>	Ratón	PyCSP	i.m., i.m. & v.	Alto nivel de protección
<i>P. berghei</i>	Ratón	Pre-eritrocitarios	i.m., i.m. & v.	Alto nivel de protección
<i>P. falciparum</i>	Mono Aotus	CPS	i.d.	Elevada respuesta inmune
<i>P. falciparum</i>	Mono Rhesus	Siete antígenos de diferentes estadios de desarrollo	v.	Alto título de Ac específicos
<i>P. falciparum</i>	Hombre	Siete antígenos de diferentes estadios de desarrollo	v.	Sin protección
<i>Leishmania major</i>	Ratón	Metaloproteínasa gp63	i.m.	Reducción de la carga parasitaria
<i>L. major</i>	Ratón	Antígeno de superficie Ag-2	i.m.	Alto grado de protección

g-g= gene gun, *v*= acarreadores virales

Tabla 15. Vacunación con ADN en parásitos (*cont.*).

Parásito	Hospedero	Antígeno	Vía de administración	Resultados
<i>L. major</i>	Ratón	Antígeno de superficie gp46/M2	i.m.	Efecto terapéutico en ratones infectados
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ratón	Genoteca	i.m.	Alto título de anticuerpos IgG específicos
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ratón	SAGI Antígeno de superficie	i.m.	Buena eficacia preventiva
<i>Schistosoma japonicum</i>	Ratón	26 kDa GST	i.m.	Sin protección
<i>S. mansoni</i>	Ratón	Sm23	i.m.	63% de protección
<i>S. mansoni</i>	Ratón	Calpaína	g-g	60% de protección
<i>Taena ovis</i>	Ratón	Diferentes formas de 45W	i.m.	Diferentes títulos de Ac
<i>Fasciola hepatica</i>	Ratas	Cisteín proteasa	i.m.	74% de protección–hembras, 100% de protección–machos

g-g= gene gun, v= acarreadores virales

Virus

HIV

La alta variabilidad de este virus ha contribuido a numerosos fracasos en el desarrollo de vacunas que neutralicen al SIDA; actualmente, se estima que más de 35 millones de personas están infectadas por el HIV en todo el mundo, lo que hace urgente el desarrollo de una vacuna profiláctica y terapéutica que pueda combatir esta pandemia. Lógicamente, el producto que se pretende lograr debe generar una respuesta inmune celular y humoral, que no sólo alcance el nivel sistémico sino que también incluya a las mucosas, a fin de evitar la entrada del virus por vía sexual (154).

Es importante señalar que los genes del virus utilizados en las vacunas de ADN se relacionan con diversos antígenos, entre los cuales destacan los que codifican para la proteína estructural *gag*, las proteínas no estructurales *tat* y *Rev*, así como las accesorias *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*; estas últimas son consideradas “blancos” atractivos para el desarrollo de vacunas multivalentes contra el HIV-1, ya que están ampliamente conservadas y, al parecer, son importantes para la replicación del virus y la patogénesis de la enfermedad (131, 154).

En general, se han realizado diversos estudios con vacunas de ADN contra el HIV-1, utilizándose a los genes *env/rev*, tanto en personas infectadas como en no infectadas por el virus; la inyección de altas dosis de la vacuna en los individuos no infectados produjo respuestas humorales antígeno-

específicas, así como la producción de INF- γ y β -quimiocinas; por el contrario, la misma aplicación en individuos infectados originó una moderada respuesta de anticuerpos, sin respuesta celular contra el virus. Estos últimos resultados son cuestionables, ya que en otro trabajo efectuado con individuos infectados se incluyó a los genes *rev*, *nef* y *tat*, y se evidenció un incremento en cuanto a la respuesta celular, en un amplio rango de dosis (20 a 2500 μ g) y sin que ocurrieran reacciones locales (116, 141).

Recientemente, se busca inducir la producción de anticuerpos y linfocitos de memoria, los cuales reconozcan al mayor número de subtipos identificados del virus; las vacunas de ADN involucradas contienen al gen *env* y se aplican durante la fase de inducción de la respuesta inmune y, como refuerzo, se administran vacunas compuestas por las glucoproteínas recombinantes *gp120* o *gp160*, las cuales forman parte de la envoltura del virus (131).

Influenza

Las vacunas de ADN que codifican para nucleoproteínas del virus de la influenza, protegen a los ratones contra la infección correspondiente, induciendo una respuesta humoral y celular (162).

Hepatitis B

Las vacunas de ADN que codifican para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), han generado buenos resultados en modelos animales; la administración de tres dosis con 1, 2 y 4 μg –mediante bombardeo con partículas– dan lugar a una respuesta inmune que implica niveles protectores de anticuerpos y linfocitos T CD8+ y CD4+, así como la producción de INF- γ (45).

Otras enfermedades

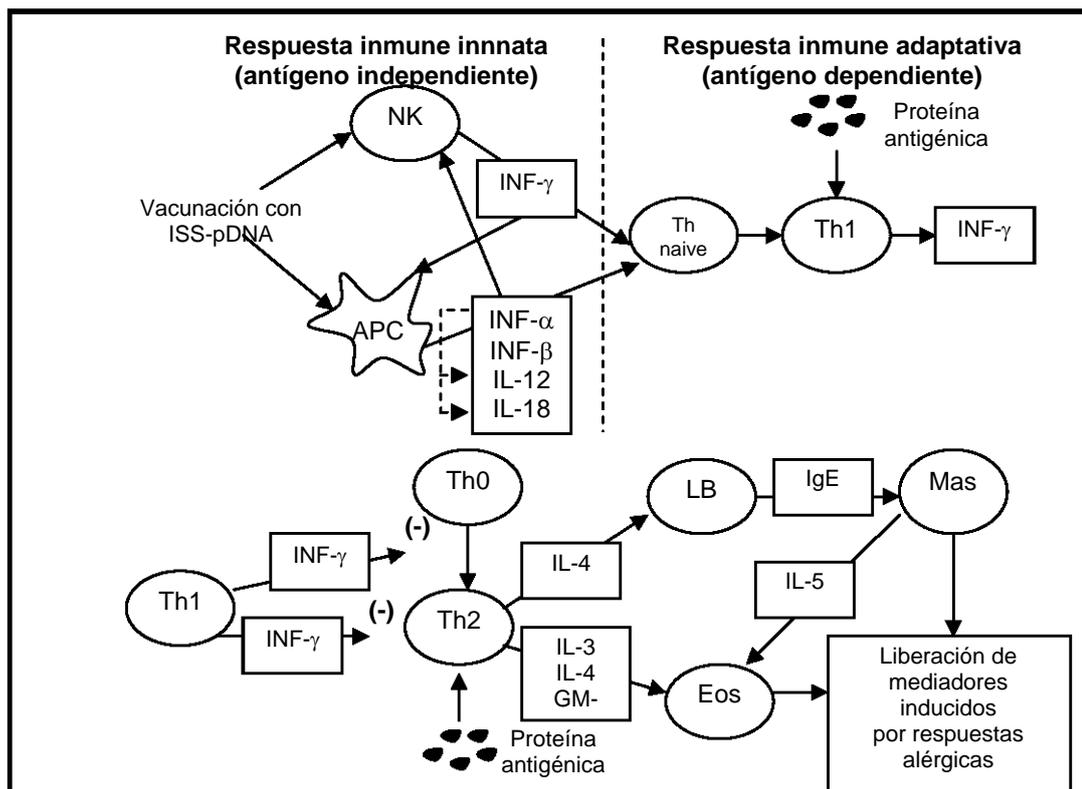
Alergias tipo I

Las respuestas alérgicas tipo I son mediadas por anticuerpos IgE; el primer contacto con el alérgeno provoca una diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2 y estimula la producción de anticuerpos IgE e IgG1 por parte de los linfocitos B, lo cual es regulado por la secreción de IL-4; los anticuerpos IgE se unen a los receptores Fc de los mastocitos y éstos se activan por una reexposición al alérgeno liberando mediadores inflamatorios, tales como la histamina y las prostaglandinas, responsables directas de las reacciones patológicas (92, 94, 122, 191).

La vacunación con ADN ha sido utilizada para tratar este tipo de trastornos, debido a que inducen una respuesta Th1, vía los motivos CpG presentes en los plásmidos; de esta manera, la exposición al alérgeno provoca la secreción de INF- γ , lo que inhibe las respuestas Th2 que generan los fenómenos de hipersensibilidad inmediata (consultar la figura 23) (37, 118, 122).

Además, los motivos CpG estimulan la proliferación de linfocitos B con un cambio de isotipo, de IgM a IgG2a, lo que bloquea el contacto de IgE con los mastocitos, reduce los niveles de sustancias inflamatorias y, obviamente, la respuesta alérgica. Por su parte, el INF- γ inhibe la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2 y la secreción de citocinas Th2 (37, 122).

Figura 23. Mecanismos involucrados en la vacunación con ADN dirigida a la neutralización de alergias (122).



Cáncer

Incuestionablemente, la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer ha fallado hasta ahora, debido a la heterogeneidad y la baja inmunogenicidad de los antígenos tumorales, y a los mecanismos de escape desarrollados por las células cancerígenas para evadir la respuesta inmunológica (197).

Sin embargo, los avances logrados con el proyecto de genoma humano, los antígenos asociados a tumores han venido siendo identificados eficazmente; al ser insertados los genes que codifican para dichos antígenos en las vacunas de ADN, se ha logrado inducir una respuesta inmune efectiva contra células cancerígenas, la cual resulta útil para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad (54, 142, 197).

En diversos estudios realizados con vacunas de ADN se ha conseguido reducir o inhibir el crecimiento de células tumorales, vía la producción y secreción de la proteína antigénica. Por ejemplo, respuestas humorales y celulares muy intensas se han generado en ratones vacunados con ADN que codifica para el antígeno específico de la próstata (PSA). No obstante, es importante considerar que las vacunas de ADN persisten por tiempos prolongados y que ello representa un riesgo adicional en el desarrollo de tumores (137, 197).

CONCLUSIONES

- ❖ La vacunación representa uno de los grandes éxitos de la salud pública, en virtud de que ha permitido salvar la vida de millones de personas, previniendo, controlando y, en algunos casos, erradicando enfermedades infecciosas.

- ❖ La crisis financiera asociada a la investigación, desarrollo y producción de vacunas, en ocasiones ha generado problemas en cuanto al suministro de los productos; se debe considerar que los beneficios de la vacunación sólo son evidentes cuando ésta forma parte de rigurosas campañas y que los costos de prevención de cualquier enfermedad son mucho menores que los del tratamiento. Tomando en cuenta lo anterior, es necesario definir las opciones más rentables de producción de vacunas, para realizar las inversiones pertinentes.

- ❖ A lo largo de la historia los componentes de las vacunas se han modificado radicalmente, se trate de microorganismos completos, o bien, de subunidades provenientes de ellos; no obstante, su baja inmunogenicidad y efectos adversos han dado origen al desarrollo de las vacunas denominadas de “tercera generación”.

- ❖ Los avances en la ingeniería genética, bioinformática e inmunología han modificado las metodologías involucradas en el desarrollo de

vacunas. En este sentido, los novedosos sistemas de producción y formulación prometen mejorar notablemente la efectividad de los productos vacunales.

- ❖ La vacunación con ADN presenta varias ventajas en comparación con las vacunas “convencionales”, sobre todo en lo referente a la respuesta inmune y al costo de manufactura. Sin embargo, su eficacia no ha podido ser reproducida en seres humanos, por lo que las investigaciones deben continuar en el desarrollo de mejores adyuvantes, sistemas de liberación, vías de administración y optimización de los niveles de expresión del antígeno.
- ❖ Si bien los resultados obtenidos en modelos animales vacunados con ADN justifican plenamente la realización de ensayos clínicos en humanos, debe hacerse énfasis en los problemas de seguridad del producto antes de su comercialización.
- ❖ La vacunación con ADN podría llegar a ser la solución contra diferentes enfermedades que representan problemas serios a nivel mundial y contra las cuales aún no existen vacunas. Sin embargo, se trata de una metodología relativamente reciente, sobre la cual continúan existiendo mecanismos desconocidos que es necesario establecer.

ABREVIATURAS

A	Adenina
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
Ag	Antígeno
APC*	Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
BG	Fantasma Bacteriano
C	Citosina
CD*	Grupo de Diferenciación
CMI*	Inmunidad Mediada por Células
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CTL*	Linfocitos T citotóxicos
DCs*	Células Dendríticas
DHT*	Hipersensibilidad de tipo retardada
Eos	Eosinófilos
FCA	Adyuvante Completo de Freund
FDA*	Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
g	Gramos
G	Guanina
GAVI*	Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización
GM-CSF*	Factor Estimulante de Colonias de Monocitos y Granulocitos
H	Horas
HBsAg*	Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B
HCMV*	Citomegalovirus Humano
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
hsp	Proteínas de choque térmico
ICAM*	Molécula de adhesión intercelular
i.d.	Intradérmico
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
i.n.	Intranasal
INF	Interferón
ISS	Secuencias inmunoestimuladoras
i.v.	Intravenoso

* Por sus siglas en inglés

Kb	Kilo base
KDa	Kilo Daltons
Kg	Kilogramos
LC*	Células de Langerhans
LB	Linfocitos B
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
Mas	Mastocitos
mg	Miligramos
MHC*	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP*	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
MPL*	Lípido A Monofosforilado
ng	Nanogramos
NK*	Células asesinas naturales
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
ODN	Oligodesoxinucleótidos
ORF*	Marcos abiertos de lectura
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
PRR*	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PSA	Antígeno Específico de la Próstata
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T	Timina
TB	Tuberculosis
TCR	Receptor de Células T
TD*	Antígenos dependientes de linfocitos T
TGF*	Factor de Crecimiento Transformador
Th	Linfocitos T cooperadores
TI	Antígenos independientes de linfocitos T
TLR-9*	Receptor de tipo Toll-9
TNF*	Factor de Necrosis Tumoral
UNESCO*	Organización para la Educación, la Ciencia y la Cultura de las Naciones Unidas
µg	Microgramos

* Por sus siglas en inglés

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas K.A. y Lichtman H.A.:
INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
5ª edición, España: Elsevier España, 2004.
2. Adu B.J., Capecchi B., Serruto D., Rappuoli R. and Pizza M.: Two years into reverse vaccinology, **Vaccine**, 2003; 21: 605–610.
3. Alpar O.H., Somavarapu S., Atuah N.K. and Bramwell W.V.: Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery; **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 411-430.
4. André E.F.: Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises, **Vaccine**, 2003; 21: 593–595.
5. Arnon R. and Ben-Yedidia T.: Old and new vaccine approaches, **International Immunopharmacology**, 2003; 3: 1195– 1204.
6. Audibert F.: Adjuvants for vaccines, a quest, **International Immunopharmacology**, 2003; 3: 1187–1193.
7. Azimpour T.C., Walcher P., Beate M.U., Stiedl T., Binder M., McGrath J. and Lubitz W.: Bacterial ghosts – biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs, **Current Opinion in Biotechnology**, 2004; 15:530–537.
8. Back A. and Rappuoli R.: Vaccinology at the beginning of the 21st century, **Current Opinion in Immunology**, 2005, 17:411–418.
9. Babiuk A.L.: Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine, **The Veterinary Journal**, 2002; 164: 188-201.
10. Babiuk A.L., Pontarollo R., Babiuk S., Oler B., van Drunen Littel S.: Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals, **Vaccine**, 2003; 21: 649–658.
11. Baca-Estrada E.M., Foldvari M., Babiuk L.S. and Babiuk A.L.: Vaccine delivery: lipid-based delivery systems, **Journal of Biotechnology**, 2000; 83: 91–104.
12. Back A. and Rappuoli R.: Vaccinology at the beginning of the 21st century, **Current Opinion in Immunology**, 2005; 17: 411–418.

13. Banks E.R., Dunn J.M., Hochstrasser FD, Sanchez CJ, Blackstock W, Pappin J.D. and Selby J.P.: Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities, **The Lancet**, 2000; 356: 1749-1757.
14. Batson A.: The Problems And Promise Of Vaccine Markets In Developing Countries, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 690-695.
15. Bayas M.J. y Vilella A.: Vacunación de adultos, **Vacunas**, 2000; 1(4): 173-178.
16. Bazin H.: A brief history of the prevention of infectious diseases by immunisations, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 2003; 26: 293–308.
17. Bazin H.: The ethics of vaccine usage in society: lessons from the past, **Endeavour**, 2001; 25(3): 104-108.
18. Beate M.U., Walcher P., Azimpour C., Riedmann E., Haller C. and Lubitz W.: Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1381– 1391.
19. Belardelli F. and Ferrantini M.: Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity, **Trends in Immunology**, 2002; 23(4): 201-209.
20. Ben M.L., Wechsler L.B. and Nesburn B.A.: Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow, **The Lancet Infectious Diseases**, 2002; 2: 425-432.
21. Berdasquera C.D., Cruz M.G. y Suárez L.C.: La vacunación. Antecedentes históricos en el mundo, **Rev Cubana Med Gen Integr**, 2000; 16(4): 375-378.
22. Bivas B.M., Ottenhoff H.T., Junginger E.H and Borchard G.: Pulmonary DNA vaccination: Concepts, possibilities and perspectivas, **Journal of Controlled Release**, 2005; 20: 1-29.
23. Blume S.S.: Lock in, the state and vaccine development: Lessons from the history of the polio vaccines, **Research Policy**, 2005; 34: 159–173.
24. Bologna G.B. y Cardoso B.M.: Inmunizaciones y Farmacovigilancia, **Boletín para Profesionales**, 1999; 7 (4): 51-65.
25. Bordenave G.: Louis Pasteur (1822–1895), **Microbes and Infection**, 2003; 5: 553–560.

26. Brayden J.D.: Vaccinology: the challenges for non-injected approaches, **Pharmaceutical Science & Technology Today**, 2000; 3(4): 115-118.
27. Brennan R.F. and Dougan G.: Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies, **Vaccine**, 2005; 23: 3210–3222.
28. Brewer M.J.: (How) do aluminium adjuvants work?, **Immunology Letters**, 2005; 30: 1-6.
29. Brey N.R.: Molecular basis for improved anthrax vaccines, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1266–1292.
30. Bruijn A.I., Nauta J., Cramer M.W., Gerez L., Palache M.A.: Clinical experience with inactivated, virosomal influenza vaccine, **Vaccine**, 2005; 23: 39–49.
31. Byrd W., de Lorimier A., Zheng R.Z., Cassels J.F.: Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli* and other mucosal pathogens, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1362– 1380.
32. Cabrera O., *et. al.*: New method for obtaining conjugated vaccines, **Vaccine**, 2005; 30: 1-3.
33. Casale B.T. and Omaha D.M.: Status of immunotherapy: Current and future, **J Allergy Clin Immunol**, 2004; 113:1036-1039.
34. Chakrabarti R., Zhou Z., Chang Y. and Prud'homme J.G.: A mutant B7-1/Ig fusion protein that selectively binds to CTLA-4 ameliorates anti-tumor DNA vaccination and counters regulatory T cell activity, **Vaccine**, 2005; 23: 4553-4564.
35. Chatterjee N.S. and Chaudhuri K.: Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* I. Physical and chemical characterization, **Biochimica et Biophysica Acta**, 2003; 4: 65– 79.
36. Chen T.: Vaccine innovations in an age of uncertainty: BCG in France, **Technology in Society**, 2005; 27: 39–53.
37. Chinen J. and Shearer T.W.: Basic and clinical immunology, **J Allergy Clin Immunol**, 2005; 116(2): 411-417.
38. Cho W.M.: Subunit Protein Vaccines: Theoretical and Practical Considerations for HIV-1, **Current Molecular Medicine**, 2003; 3: 243-263.

39. Cleland L.J.: Single-administration vaccines: controlled release technology to mimic repeated immunizations, **Trends in Biotechnology**, 1999; 17: 25-30.
40. Coleman S.M., Sangrue N., Zhou F. and Chu S.: Factors Affecting U.S. Manufacturers' Decisions To Produce Vaccines, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 635-644.
41. Cui Z., Baizer L. and Mumper J.R.: Intradermal immunization with novel plasmid DNA-coated nanoparticles via a needle-free injection device, **Journal of Biotechnology**, 2003; 102: 105-115.
42. Daemen T., Mare T., Bungener L., Jorge J., Huckriede A. and Wilschut J.: Virosomes for antigen and DNA delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 451– 463.
43. Darji A., zur Lage S., Garbe I.A., Chakraborty T. and Weiss S.: Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2000; 27: 341-349.
44. De Magistris M.: Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2006; 20: 1-16.
45. Dean J.H., Haynes J. and Schmaljohn C.: The role of particle-mediated DNA vaccines in biodefense preparedness, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1315– 1342.
46. Dean J.H., Fuller D. and Osorio E.J.: Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 2003; 26: 373–388.
47. Dellepiane N., Griffiths E. y Milstien B.J.: Nuevos retos para asegurar la calidad de las vacunas, **Boletín de la Organización Mundial de la Salud**, 2000, 78 (2): 155–162.
48. Dietrich G., Kolb M.A., Spreng S., Scharl M., Goebel W. and Gentschev I.: Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines, **Vaccine**, 2001; 19: 2506–2512.
49. Donnelly J., Berry K. and Ulmer B.J.: Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines, **International Journal for Parasitology**, 2003; 33: 457–467.

50. Drabner B. and Guzmán A.C.: Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors, **Biomolecular Engineering**, 2001; 17: 75–82.
51. Dumonteil E.: Vacunas de DNA: el presente y el futuro, **Rev Biomed**, 2000; 11: S7-S12.
52. Dunham P.S.: The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine, **Research in Veterinary Science**, 2002; 73: 9–16.
53. Echániz A.I. and Solórzano S.F.: Meeting the Challenge: Prevention of Pneumococcal Disease with Conjugate Vaccines, **Salud, Publica Mex**, 2001; 43: 352-367.
54. El A.A.: Current strategies in cancer gene therapy, **European Journal of Pharmacology**, 2004: 498: 1– 8.
55. Ellenberg S.S., Foulkes A.M., Midthun K. and Goldenthal L.K.: Evaluating the Safety of New Vaccines: Summary of a Workshop, **American Journal of Public Health**, 2005; 95(5): 800-809.
56. Epstein A.R.: It Did Happen Here: Fear And Loathing On The Vaccine Trail, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 740-745.
57. Eriksson K. and Holmgren J.: Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants, **Current Opinion in Immunology**, 2002; 14: 666–672.
58. Etchegoin G.P.: Vaccination pattern affects immunological response, **Physica A**, 2005; 354: 393–403.
59. Felnerova D., Viret F.J., Glück R. and Moser C.: Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs, **Current Opinion in Biotechnology**, 2004; 15: 518–529.
60. Ferreira N.G., Monteiro A.G., Prazeres M.D. and Cabral M.J.: Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications, **Trends in Biotechnology**, 2000; 18: 380-389.
61. Friede M. and Aguado T.M.: Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 325– 331.
62. Galambos L., A century of innovation in vaccines, **Vaccine**, 1999; 17: S7-S10.

63. Gardiner F.D., Huang Y., Basu S., Leung L., Song Y., Chen Z. and Ho D.D.: Multiple-site DNA vaccination enhances immune responses in mice, **Vaccine**, 2005; 30: 1-6.
64. Garmory S.G., Brown A.K. and Titball W.R.: DNA vaccines: improving expression of antigens, **Genetic Vaccines and Therapy**, 2003; 1(2): 1-5.
65. Garmory S.G., Perkins D.S., Phillpotts J.R. and Titball W.R.: DNA vaccines for biodefence, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1343– 1361.
66. Garza V.R.:
BACTERIAS PATÓGENAS PARTE II
3a. edición. México: Universidad Autónoma de México, 2001.
67. Garza V.R.:
BACTERIAS PATÓGENAS PARTE IV
3a. edición. México: Universidad Autónoma de México, 2001.
68. Gil M.A. y Carrasco G.P.: Un nuevo concepto: inmunizaciones terapéuticas, **Aten Primaria**, 2003; 31(3):198-201.
69. Girard P.M., Cherian T., Pervikov Y. and Kieny P.M.: A review of vaccine research and development: Human acute respiratory infections, **Vaccine**, 2005; 30: 1-17.
70. Girard P.M., Osmano K.S. and Kieny P.M.: A review of vaccine research and development: The human immunodeficiency virus (HIV), **Vaccine**, 2006; 30: 1-20.
71. Giudice D.G.: Vaccination strategies An overview, **Vaccine**, 2003; 21: S2/83–S2/88.
72. Glück R. and Metcalfe C.I.: New technology platforms in the development of vaccines for the future, **Vaccine**, 2002; 20: B10–B16.
73. Good F.M.: Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies, **TRENDS in Parasitology**, 2005; 21: 29-34.
74. Gordon A.: Vaccines and vaccination, **The New England Journal of Medicine**, 2001; 345(14): 1042-1054.
75. Grabowski H.: Encouraging The Development Of New Vaccines, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 697-702.

76. Grandi G.: Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics, **Trends in Biotechnology**, 2001; 19(5): 181-188.
77. Grandi G.: Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies, **International Journal for Parasitology**, 2003; 33: 615–620.
78. Greenland R.J., Liu H., Berry D., Anderson G.A., Kim W., Irvine J.D., Langer R. and Letvin L.N.: β -Amino Ester Polymers Facilitate in Vivo DNA Transfection and Adjuvant Plasmid DNA Immunization, **Molecular Therapy**, 2005; 12: 164-170.
79. Griffiths F.G., Miller H.J., Suzuki T.D., Lewontin C.R. and Gelbart M.W.:
GENÉTICA
3a. edición. México: Mc Graw Hill Interamericana, 2002.
80. Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of ADN vaccines. In *WHO: Expert Committee on Biological Standardization*, Geneva, World Health Organization, 2005, Anexo 1, (WHO Technical Report Series, No. 878).
81. Hasan A.U., Abai M.A., Harper R.D., Wren W.B. and Morrow W.J.: Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines, **Journal of Immunological Methods**, 1999; 229: 1–22.
82. He X., Jiang L., Wang F., Xiao Z., Li J., Liu S.L., Li D., Ren D., Jin X., Li K., He Y., Shi K., Guo Y., Zhang Y. and Sun S.: Augmented humoral and cellular immune responses to hepatitis B DNA vaccine adsorbed onto cationic microparticles, **Journal of Controlled Release**, 2005; 107: 357–372.
83. Heath W.A., Recent advances in vaccinology, **Current Opinion in Pharmacology**, 2001; 1:425–430.
84. Henderson M.L.: Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology, **Biologicals**, 2005; 33: 203-209.
85. Herrmann E.J.: DNA vaccines against enteric infections, **Vaccine**, 2005; 30: 1-4.
86. Hilleman R.M.: Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries, **Vaccine**, 2000; 18: 1436-1447.

87. Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K. and Mharandi A.: Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges, **Vaccine**, 2003; 21: S2/89–S2/95.
88. Hunter L.R.: Overview of vaccine adjuvants: present and future, **Vaccine**, 2002; 20: S7–S12.
89. Huygen K.: Plasmid DNA vaccination, **Microbes and Infection**, 2005; 7: 932–938.
90. Jain S., Singh P, Mishra V. and S.P. Vyas P.S.: Mannosylated niosomes as adjuvant–carrier system for oral genetic immunization against Hepatitis B, **Immunology Letters**, 2005; 101: 41–49.
91. Jalava K., Hensel A., Szostak M., Resch S. and Lubitz W.: Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications, **Journal of Controlled Release**, 2002; 85: 17–25.
92. Jilek S., Merkle P.H. and Walter E.: DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 377–390.
93. Johnston A.S., Talaat M.A. and McGuire J.M.: Genetic Immunization: What's in a Name?, **Archives of Medical Research**, 2002; 33: 325–329.
94. Jurado A. y Herrero J.M.: Vacunas de ADN en el tratamiento de la alergia, **BSCP Can Ped**, 2001; 25(1): 27-35.
95. Kasturi P.S., Sachaphibulkij K. and Roy K.: Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines, **Biomaterials**, 2005; 26: 6375–6385.
96. Keegan E.M., Hudson W.J. and Saltzman M.W.: Biomimetic design in microparticulate vaccines, **Biomaterials**, 2003; 24: 4435–4443.
97. Kemp M.J., Kajihara M., Nagahara S., Sano A., Brandon M. and Lofthouse S.: Continuous antigen delivery from controlled release implants induces significant and anamnestic immune responses, **Vaccine**, 2002; 20: 1089-1098.
98. Kirman R.J. and Seder A.R.: DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory?, **Current Opinion in Immunology**, 2003; 15: 471–476.
99. Klug S.W. y Cummings R.M.:

CONCEPTOS DE GÉNETICA

5a. edición. México: Editorial Prentice Hall, 1999.

100. Kofta W. and Wedrychowicz H.: c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages, **Veterinary Parasitology**, 2001; 100: 3-12.
101. Krishnan R.B.: Current status of DNA vaccines in veterinary medicine, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2003; 43: 3–11.
102. Kurstak E.: Abstracts of the Third World Congress on Vaccines and Immunisation, **Vaccine**, 2003; 21: 580–581.
103. Kutzler A.M. and Weiner B.D.: Developing DNA vaccines that call to dendritic cells, **The Journal of Clinical Investigation**, 2004; 114(9): 1241-1245.
104. Kyd J. and Cripps A.: Identifying vaccine antigens and assessing delivery systems for the prevention of bacterial infections, **Journal of Biotechnology**, 2000; 83: 85–90.
105. Illum L., Jabbal G.I., Hinchcliffe M., Fisher N.A. and Davis S.S.: Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001; 57: 81–96.
106. Isherwood E.K., Titball W.R., Davies H.D., Felgner L.P. and Morrow W.J.: Vaccination strategies for *Francisella tularensis*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1403– 1414.
107. Lasaro O.M., Luiz B.W., Almeida S. E. and Ferreira S.C.: Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*, **Vaccine**, 2005; 23: 2430–2438.
108. Leclerc C.: New approaches in vaccine development, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 2003; 26: 329–341.
109. Lee G.C, Choi Y.S., Park H.S., Park S.K., Ryu H.S. and Sung C.Y.: The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-d-Met as a novel adjuvant for DNA vaccine, **Vaccine**, 2005; 23: 4703–4710.
110. Lee S.J., Hadjipanayis G.A. and Parker D.M.: Viral vectors for use in the development of biodefense vaccines, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 1293– 1314.

111. Lehoux E.D., Sanschagrín F. and Levesque C.R.: Discovering essential and infection-related genes, **Current Opinion in Microbiology**, 2001; 4:515–519.
112. Leitner W.W. and Restito P.N.: DNA vaccines and apoptosis: to kill or not to kill?, **The Journal of Clinical Investigation**, 2003; 112: 22-24.
113. Leitner W.W., Ying H. and Restito P.N.: DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects, **Vaccine**, 2000; 18: 765-777.
114. Leninger L.A., Nelson L.D. and Cox M.M.:
PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA
3ª edición. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 2000.
115. Lesinski B.G. and Westerink A.M.: Novel vaccine strategies to T-independent antigens, **Journal of Microbiological Methods**, 2001; 47: 135–149.
116. Levine M., Kaper B., Rappuoli R., Liu A. and Good F.:
NEW GENERATION VACCINES
3th edition. New York: Mareel Dekker, 2004.
117. Levy M.S., O’Kennedy D.R., Ayazi-Shamlou P. and Dunnill P.: Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA, **Trends in Biotechnology**, 2000; 18: 296-306.
118. Liljeqvist S. and Ståhl S.: Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines, **Journal of Biotechnology**, 1999; 73: 1–33.
119. Lindberg A.A.: Glycoprotein conjugate vaccines, **Vaccine**, 1999; 17: S28-S36.
120. Lorenzen N. and LaPatra E.S.: DNA vaccines for aquacultured fish, **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 2005; 24 (1): 201-213.
121. Lowrie B.D.: DNA vaccines for therapy of tuberculosis: Where are we now?, **Vaccine**, 2005; 30: 1-7.
122. Lowrie B.D. and Whalen G.R.:
DNA VACCINES
New jersey: Human Press, 1999.

123. Lubitz W., Witte A., Eko O.F., Kamal M., Jechlinger W., Brand E., Marchart J., Haidinger W., Huter V., Felnerova D., Alves S.N., Lechleitner S., Melzer H., Szostak P.M., Resch S., Mader H., Kuen B., Mayr B., Mayrhofer P., Geretschläger R., Haslberger A. and Hensel A.: Extended recombinant bacterial ghost system, **Journal of Biotechnology**, 1999; 73: 261-273.
124. Mäkelä P.H.: Vaccines, coming of age after 200 years, **FEMS Microbiology Reviews**, 2000; 24: 9-20.
125. Marshall J.D., Rudnick A.K., McCarthy G.S., San Mateo R.L., Harris C.M., McCauley C. and Linda A. Snyder A.L.: Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine, **Vaccine**, 2005; 30: 1-10.
126. Mastroeni P., Chabalgoity A.J., Dunstan J.S., maskell J.D. and Dougan G.: *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines, **The Veterinary Journal**, 2000, 161: 132–164.
127. Matsumoto Y.: Characterization of T cell receptor (TCR) of organ-specific autoimmune disease-inducing T cells and TCR-based immunotherapy with DNA vaccines, **Journal of Neuroimmunology**, 2000; 110: 1–12.
128. Mayrhofer P., Azimpour T.C., Walcher P., Haidinger W., Jechlinger W. and Lubitz W.: Immobilization of plasmid DNA in bacterial ghosts, **Journal of Controlled Release**, 2005; 102: 725–735.
129. Medi M.B. and Singh J.: Skin targeted DNA vaccine delivery using electroporation in rabbits II. Safety, **International Journal of Pharmaceutics**, 2005; 30: 1-8.
130. Medina E. and Guzmán C.: Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations, **Vaccine**, 2001; 19: 1573–1580.
131. Medrano S.L., Pérez A.L., Thomson O.M. y Nájera M.R.: Avances en el desarrollo de vacunas frente al SIDA, **PUB. OF. SEISIDA**, 2002; 13(8): 520-526.
132. Metz B., Hendriksen F.C., Jiskoot W. and Kersten F.G.: Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems, **Vaccine**, 2002; 20: 2411–2430.
133. Minna S.A. and Markel H.: The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 611-623.

134. Mor G.: Plasmid DNA: A New Era in Vaccinology, **Biochemical Pharmacology**, 1998; 55: 1151–1153.
135. Mora M., Veggi D., Santini L., Pizza M. and Rappuoli R.: Reverse vaccinology, **Drug Discovery Today**, 2003; 8(10): 459-475.
136. Morel A.P., Falkner D., Plowey J., Larregina T.A. and Falo D.L.: DNA immunisation: altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response, **Vaccine**, 2004; 22: 447–456.
137. Moreno S. and Timón M.: DNA vaccination: an immunological perspective, **Inmunología**, 2004; 23(1): 41-55.
138. Mumper J.R. and Cui Z.: Genetic immunization by jet injection of targeted pDNA-coated nanoparticles, **Methods**, 2003; 31: 255–262.
139. Mutwiri K.G., Nichani K.A., Babiuk S. and Babiuk A.L.: Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides, **Journal of Controlled Release**, 2004; 97: 1– 17.
140. Nalin R.D.: Evidence based vaccinology, **Vaccine**, 2002; 20: 1624–1630.
141. Nkolola P.J. and Essex M.: Progress towards an HIV-1 subtype C vaccine, **Vaccine**, 2006; 24: 391–401.
142. Noris G. E. and Torrilla A.: Vacunas en melanoma, **Oncología**, 2004; 27(3):108-113.
143. NORMA Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.
144. O'Hagan T.D. and Rappuoli R.: The safety of vaccines, **Drug Discovery Today**, 2004; 9(19): 846-855.
145. Offit A.P.: Why Are Pharmaceutical Companies Gradually Abandoning Vaccines?, **Health Affairs**, 2005; 24(3): 622-632.
146. Oh Y., Park J., Yoon H. and Kim C.: Enhanced mucosal and systemic immune responses to a vaginal vaccine coadministered with RANTES-expressing plasmid DNA using in situ-gelling mucoadhesive delivery system, **Vaccine**, 2003; 21: 1980–1988.

147. Orme M.I., McMurray N.D. and Belisle T.B.: Tuberculosis vaccine development: recent progress, **TRENDS in Microbiology**, 2001; 9(3): 115-119.
148. Orme M.I.: Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review, **Vaccine**, 2005; 30: 1-18.
149. Oshop L.G., Elankumaran S. and Heckert A.R.: DNA vaccination in the avian, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2002; 89: 1-12.
150. Pizza M., Giuliani M.M., Fontana R.M., Monaci E., Douce G., Dougan G., Mills G.H., Rappuoli R. and Del Giudice G.: Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants, **Vaccine**, 2001; 19: 2534-2541.
151. Plotkin A.P.: Vaccination against the major infectious diseases, **Life Sciences**, 1999; 322: 943-951.
152. Plotkin A.S. and Orenstein A.W.:
VACCINES
3th edition. London: W.B. Saunder Company, 1999.
153. Prather J.K., Sagar S., Murphy J. and Chartrain M.: Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification, **Enzyme and Microbial Technology**, 2003; 33: 865-883.
154. Puaux L.A. and Michel L.M.: New gene-based approaches for an AIDS vaccine, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 2003; 26: 357-372.
155. Qin H., Zhou C., Wang D., Ma W., Liang X., Lin C., Zhang Y. and Zhang S.: Specific antitumor immune response induced by a novel DNA vaccine composed of multiple CTL and T helper cell epitopes of prostate cancer associated antigens, **Immunology Letters**, 2005; 99: 85-93.
156. Ramos P.D., Gómez C.M. y Fernández M.D.: Métodos de obtención de microesferas biodegradables; **Rev Cubana Farm**, 2001; 35(2): 126-135.
157. Rangarajan N.P.: DNA Vaccines, **Resonance**, 2002; 25-35.
158. Rao S.S, Gomez P., Mascola R.J., Dang V., Krivulka R.G., Yu F., Lord I.C., Shen L., Bailer R., Nabel J.G. and Letvin L.N.: Comparative evaluation of three different intramuscular delivery

- methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model, **Vaccine**, 2006; 24: 367–373.
159. Rappuoli R.: Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development, **Vaccine**, 2001; 19: 2688–2691.
160. Rappuoli R.: Reverse vaccinology, **Current Opinion in Microbiology**, 2000; 3: 445–450.
161. Reinert R.R.: Pneumococcal conjugate vaccines—a European perspective, **International Journal of Medical Microbiology**, 2004; 294: 277–294.
162. Rimmelzwaan F.G. and Osterhaus D.A.: Influenza vaccines: new developments, **Current Opinion in Pharmacology**, 2001; 1: 491–496.
163. Río C.C. y Franco P. C.: Bioterrorismo: un nuevo problema de salud pública, *Salud Pública de México*, 2001; 43(6): 585-589.
164. Robinson H.W., Garren H., Utz J.P. and Steinman L.: Proteomics for the Development of DNA Tolerizing Vaccines to Treat Autoimmune Disease, **Clinical Immunology**, 2002; 103(1): 7–12.
165. Robinson A., Hudson J. and Granage P.:
VACCINE PROTOCOLS
2th edition. New Jersey: Human Press, 2003.
166. Rodríguez O.A.: El reto de obtener respuestas inmunogénicas en mucosas. Uso de coadyuvantes, **Revista Alergia México**, 2003; L (4):161-165.
167. Roitt M.I. and Delves J.P.:
INMUNOLOGÍA FUNDAMENTOS
10^a edición. México: Editorial Panamericana, 2003.
168. Rolland A.: Gene medicines: The end of the beginning?, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005; 57: 669– 673.
169. Roos K.A., Moreno S., Leder C., Pavlenko M., King A. and Pisa P.: Enhancement of Cellular Immune Response to a Prostate Cancer DNA Vaccine by Intradermal Electroporation, **Molecular Therapy**, 2006; 13(2): 320-328.

170. Ryan J.E., Daly M.L. and Mills G.H.: Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes, **TRENDS in Biotechnology**, 2001; 19(8): 293-304.
171. Ryu D.Y. and Nam D.: Biomolecular engineering: a new frontier in biotechnology, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000; 10: 23–37.
172. Samuelson P., Gunneriusson E., Nygren P. and Ståhl S.: Display of proteins on bacteria, **Journal of Biotechnology**, 2002; 96: 129–154.
173. Sansom C.: A future vaccine for diabetes?, **Drug Discovery Today**, 2001; 6(7): 332-333.
174. Sasaki S., Takeshita F., Xin K., Ishii N. and Okuda K.: Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines, **Methods**, 2003; 31: 243–254.
175. Scarselli M., Giuliani M., Adu-Bobie J., Pizza M. and Rappuoli R.: The impact of genomics on vaccine design, **Trends in Biotechnology**, 2005; 23(2): 84-92.
176. Scheule K.R.: The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2000; 44: 119–134.
177. Schoen C., Stritzker J., Goebel W. and Pilgrim S.: Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization, **International Journal of Medical Microbiology**, 2004; 294: 319–335.
178. Sela M., Arnon R. and Schechter B.: Therapeutic vaccines: realities of today and hopes for the future, **Drug Discovery Today**, 2002; 7(12): 664-674.
179. Setia S., Mainzer H., Washington L.M., Coil G., Snyder R. and Weniger G.B.: Frequency and causes of vaccine wastage, **Vaccine**, 2002; 20: 1148–1156.
180. Shams H.: Recent developments in veterinary vaccinology, **The Veterinary Journal**, 2005; 170: 289–299.
181. Shata T.M., Stevceva L., Agwale S., Lewis K.G. and Hone M.D.: Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors, **Molecular Medicine Today**, 2000; 6: 66-71.

182. Shroff E.K., Smith R.L., Baine Y. and Higgins J.T.: Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium, **Pharmaceutical Science & Technology Today**, 1999; 2(5): 205-213.
183. Siegrist C.: Neonatal and early life vaccinology, **Vaccine**, 2001; 19: 3331–3346.
184. Smith A.H. and Klinman M.D.: The regulation of DNA vaccines, **Current Opinion in Biotechnology**, 2001; 12: 299–303.
185. Spack G.E. and Sorgi L.F.: Developing non-viral DNA delivery systems for cancer and infectious disease, **Drug Discovery Today**, 2001; 6(4): 186-197.
186. Spier E.R.: Perception of risk of vaccine adverse events: a historical perspective, **Vaccine**, 2002; 20: S78–S84.
187. Spitz M.: Vacunas de ADN desnudo, **Medicina**, 2000; 60(5):639-644.
188. Sumida M.S., McKay F. P., Truitt M.D., Kishko G.M., C. Arthur C.J., Reaman S.M., Jackson S.S., Gorgona A.D., Lifton A.M., Letvin L.N., and Barouch D.H.: Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines, **The Journal of Clinical Investigation**, 2004; 114(9): 1334-1343.
189. Suñol A.M.: La real expedición filantrópica de la vacuna (1803-1806), **Bol. S Vasco-Nav Pediatr**, 2004; 37: 28-29.
190. Vajdy M. and O'Hagan T.D.: Microparticles for intranasal immunization, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001; 51: 127–141.
191. Valenta R. and Kraft D.: From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy, **Current Opinion in Immunology**, 2002; 14:718-727.
192. van der Lubben M.I., Verhoef C.J., Borchard G. and Junginger E.H.: Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2001; 14: 201–207.
193. van der Lubben M.I., Verhoef C.J., Borchard G. and Junginger E.H.: Chitosan for mucosal vaccination, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001; 52: 139–144.

194. Vázquez J.R., Barrera S.H. y Ascencio V.F.: Clonación molecular de proteínas de membrana externa de *Aeromonas veronii*, **Ciencia UANL**, 2004; 8(4): 475-482.
195. Walter E., Moelling K., Pavlovic J. and Merkle P.H.: Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, **Journal of Controlled Release**, 1999; 61: 361-374.
196. Wikman M., Friedman M., Pinitkiatisakul S., Andersson C., Hemphill A., Bengtsson L.K., Lundén A. and Stefan Ståhl: General strategies for efficient adjuvant incorporation of recombinant subunit immunogens, **Vaccine**, 2005; 23: 2331-2335.
197. Wlazlo P.A. and Ertl C.J.: DNA Tumor Vaccines, **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 2001; 49: 1-11.
198. Zambrano B.: Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas, **Rev Med Uruguay**, 2004; 20: 4-11.
199. Zhu K., Jin H., Ma Y., Ren Z., Xiao C., He Z., Zhang F., Zhu Q. and Wang B.: A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA, **Journal of Biotechnology**, 2005; 118: 257-264.
200. Zubeldia M.J. y Raz E.: Tratamiento de las enfermedades alérgicas con secuencias inmunomoduladoras de ADN, **Alergol Inmunol Clin**, 2001; 16: 13-22.
201. Zubeldia M.J.: Nuevas perspectivas en el tratamiento de la alergia a alimentos, **Alergol Inmunol Clin**, 2001; 16(2): 158-168.