



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ADYUVANTES EN VACUNAS INTRANASALES**

*TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANDREA GUADALUPE CIROS ORTIZ**

TUTOR: DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: TANIA CAMPOS GONZALEZ**

**VOCAL: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS**

**1er. SUPLENTE: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON**

**2° SUPLENTE: VERONICA ZAMORA SALAZAR**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CUBICULO 119, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM. CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**FABIO ALEXIS VENGOECHEA GOMEZ**

**SUSTENTANTE:**

**ANDREA GUADALUPE CIROS ORTIZ**

## INDICE

<b>Capítulo 1. Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivo general.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Objetivos particulares .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo 3. Sistema Inmune .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Organización anatómica .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2. Tipos de inmunidad .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2.1. Sistema Inmune Innato .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.2. Sistema Inmune Adquirido .....</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 4. Vacunas .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Composición .....</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Tipos de vacunas.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3. Producción de vacunas.....</b>	<b>16</b>
<b>4.3.1. Embrión de pollo .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3.2. Cultivo celular .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4. Vías de administración.....</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 5. Vía intranasal .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Anatomía y fisiología nasal .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1.1. Nariz externa .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1.2. Cavidad nasal.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1.3. Epitelio nasal.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2. Administración nasal.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Consideraciones para que ocurra la absorción .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4. Mecanismos de permeación .....</b>	<b>32</b>
<b>5.5. Mucoadhesión.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4. Destino de la administración.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4.1. Local .....</b>	<b>39</b>
<b>5.4.2. Sistémico.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4.3. Sistema Nervioso .....</b>	<b>39</b>
<b>5.5. Formas farmacéuticas.....</b>	<b>40</b>

5.6. Técnicas y dispositivos de administración .....	43
<b>Capítulo 6. Adyuvantes.....</b>	<b>46</b>
6.1. Generalidades .....	46
6.2. Sales de Aluminio .....	51
6.3. Productos bacterianos .....	53
6.3.1. Toxina del colera .....	53
6.3.2. Monofosforil Lípido A (MPL) .....	54
6.4. Patrones moleculares asociados a patógenos .....	54
6.4.1. Flagelina .....	55
6.4.2. Oligodesoxinucleótidos (CpG-ODN) .....	55
6.4.3. Lipopolisacárido (LPS) .....	56
6.5. Saponinas .....	57
6.6. Sistemas de liberación particulados .....	57
6.6.1. Emulsiones.....	58
6.6.2. Nanopartículas.....	64
6.6.3. Liposomas.....	65
6.6.4. Virosomas .....	66
6.6.5. ISCOMs .....	67
6.6.6. Proteosomas .....	68
6.6.7. SMBV .....	69
6.6.8. PLA, PLGA y PEG .....	70
6.6.9. Quitosano .....	71
6.6.10. Alginato y dextrano .....	72
6.7. Citocinas .....	73
6.8. Sistemas de adyuvantes .....	74
6.8.1. AS04.....	74
6.8.2. AS01.....	75
6.8.3. AS02.....	75
<b>Capítulo 7. Conclusiones .....</b>	<b>76</b>
<b>Capítulo 8. Perspectivas.....</b>	<b>76</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>78</b>

## Abreviaturas

Ac: Anticuerpo

Al (OH)<sub>3</sub>: Hidróxido de aluminio

AlOHPO<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato fosfato de aluminio

AlPO<sub>4</sub>: Fosfato de aluminio

BCP: Receptor específico de linfocitos B

BHE: Barrera Hematoencefálica

CD: Células Dendríticas

CPAs: Células Presentadoras de Antígeno

CpG: Citosina y Guanina unidas por fosfatos

CPH: Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

CPH I: Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (Major Histocompatibility Complex Class I)

CPH II: Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II (Major Histocompatibility Complex Class II)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FAD: Food And Drug Administration

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HSV: Virus del Herpes Simple

IFN: Interferón

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

ISCOMs: Complejos Inmunoestimuladores

LPS: Lipopolisacárido

MAC: Complejo de Ataque de Membrana (*Membrane Attack Complex*)

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas" (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)

MDP: Muramildipéptido

MPL: Monofosforil lípido A

NALT: Tejido Linfoide Asociado a Nariz (*Nasal-Associated Lymphoid Tissue*)

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Células asesinas naturales (*Natural Killers Cells*)

PAM: Péptido Microbiano

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patter*)

PLA: Poli (DL-láctico)

PLGA: Poli (ácido DL-láctico-glicólico)

PMN: Polimorfonucleares

PMPs: Patrones Moleculares asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Pattern*)

PRM: *Receptores de Reconocimiento de Moléculas* (*Patter Recognition Molecules*)

Quil-A: *Quillaja saponaria molina*

SNC: *Sistema Nervioso Central*

Th: Linfocitos T cooperadores

Tc: Linfocitos T citotóxicos

TLR: Receptor tipo Toll (*Toll Like Receptor*)

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa (*Tumoral Necrosis Factor Alpha*)

VPH: Virus del Papiloma Humano

## **Capítulo 1. Objetivos**

### **1.1 Objetivo general**

- Desarrollar una investigación bibliohemerográfica sobre los avances que a la fecha existen acerca de los adyuvantes utilizados en vacunas intranasales.

### **1.2. Objetivos particulares**

- Entender como es que participa el sistema inmune tras la administración de una vacuna intranasal.
- Conocer el papel de los adyuvantes en la elaboración de vacunas, así como su toxicidad y clasificarlos de acuerdo a su mecanismo de acción.
- Saber la composición de una vacuna.
- Conocer las características mas relevantes de la administración nasal.



## **Capítulo 2. Introducción**

La vacunación es uno de los logros más exitosos al momento en la ciencia médica; la cual tiene como finalidad generar una respuesta inmune local y sistémica ante la mayoría de patógenos que colonizan e invaden principalmente las superficies mucosas, sitio en el cual da inicio la infección.

A la fecha la vía nasal, constituye una estrategia alternativa y prometedora para la entrega de vacunas, ya que genera una respuesta inmune humoral, celular y mucosa efectiva frente a enfermedades infecciosas.

En la actualidad, se están realizando muchos esfuerzos para desarrollar formulaciones y dispositivos de administración eficaces para la administración de las mismas, sin embargo, la entrega de antígenos hacia y a través de las barreras mucosas sigue siendo un desafío debido a las condiciones fisiológicas adversas (pH, enzimas, aclaramiento mucociliar) y las barreras biológicas creadas por las uniones epiteliales estrechas que restringen el transporte de macromoléculas a través de esta; es por ello que para mejorar la respuesta de estos antígenos, se han estudiado y desarrollado adyuvantes que permiten estimular el sistema inmune más rápidamente y con efectividad, induciendo así una respuesta protectora de manera segura.

En el presente trabajo se pretende dar a conocer las principales características que conlleva la administración nasal de vacunas, además de mostrar cómo es que se genera una respuesta inmune en la mucosa nasal y los tipos de adyuvantes más utilizados actualmente en la formulación de las mismas.

### Capítulo 3. Sistema Inmune

El ser humano se encuentra expuesto a un gran número de agentes infecciosos entre los que destacan hongos, bacterias, virus, parásitos o cualquier molécula capaz de interactuar con componentes específicos del cuerpo.

En contraparte hemos desarrollado un conjunto de mecanismos de defensa, denominado *sistema inmune*, cuya función principal es establecer un estado de *inmunidad*, en otras palabras, de protección frente a la entrada de sustancias y patógenos ajenos al cuerpo, mediante la capacidad que tiene de distinguir entre células del organismo de componentes que no son propios del mismo. El término inmunidad proviene del latín *inmunitas* que significa “exento de”.

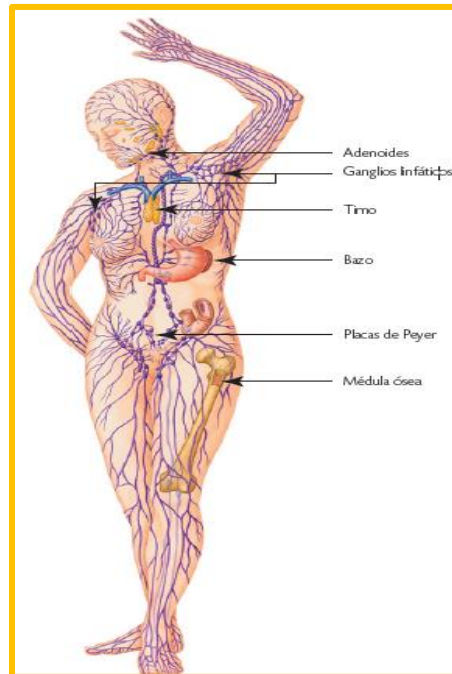
Nuestro sistema inmune está organizado en un sistema inmune innato y un sistema inmune adquirido, ambas respuestas involucran la actuación de células como: Linfocitos T y B, células NK, macrófagos y PMN dentro de la cual se encuentran basófilos, eosinófilos y neutrófilos; aunque también hay presencia de moléculas tales como las proteínas del complemento, citocinas, quimiocinas, interferones, péptidos antimicrobianos y anticuerpos.

En resumen, nuestro sistema inmune, trabaja mediante una sofisticada red de órganos, tejidos, células y moléculas; que en conjunto provocaran una reacción conjunta y coordinada de defensa frente a microorganismos, proteínas, polisacáridos y compuestos químicos, a lo anterior se le conoce como *respuesta inmune*. (1,2)

#### 3.1. Organización anatómica

Los órganos que conforman al sistema inmune se encuentran localizados estratégicamente en todo el cuerpo y de acuerdo a su función se clasifican en dos categorías:

- **Primarios o centrales:** Conformados por la médula ósea y el timo.
- **Secundarios o periféricos:** Conformado por el bazo, ganglios linfáticos, adenoides, amígdalas y tejido asociado a mucosas. (MALT)



**Figura 1.** Sistema linfático. Adaptado de Cedillo, B. A. et al. *¿Qué es y cómo funciona el sistema inmune?*

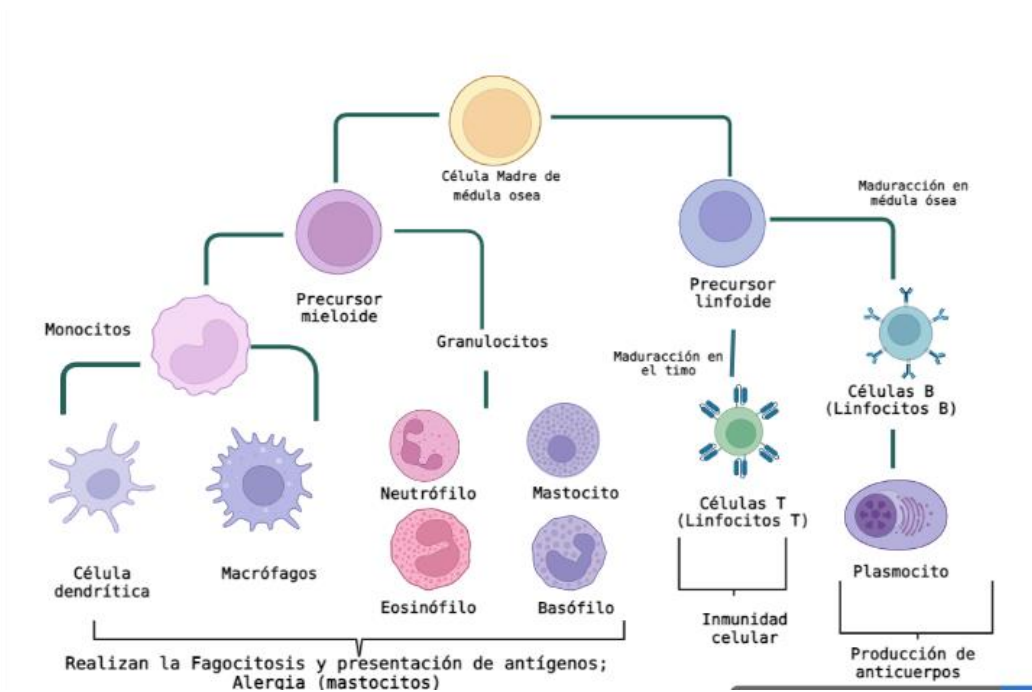
La respuesta inmune es el resultado de las acciones de células que circulan a través de la sangre y la linfa, que interactúan directa o indirectamente con cada uno de los órganos. (2,3)

La sangre humana se compone de eritrocitos o glóbulos rojos y en alrededor de un 0.1% de glóbulos blancos nucleados mejor conocidos como *leucocitos*. Los *leucocitos* incluyen células fagocíticas como los monocitos, linfocitos y células especializadas en la producción de anticuerpos y en la inmunidad mediada por células. La sangre es bombeada por el corazón a través de arterias y capilares a través del cuerpo y retorna mediante las venas. En el lecho de los capilares los leucocitos y solutos pasan desde la sangre al sistema linfático que llamaremos linfa.

La linfa se drena desde los tejidos extravasculares a los capilares, conductos y ganglios linfáticos, estos últimos contienen grandes cantidades de linfocitos y fagocitos.

El MALT es parte de este sistema e interacciona con microorganismos que provienen de las mucosas del cuerpo como la nasal, intestinal y la bronquial por mencionar algunas. (3)

Es importante recordar que las células que participan en la inmunidad innata como la adquirida, se desarrollan a partir de células madre pluripotentes provenientes de la médula ósea, en donde pueden diferenciarse en dos precursores ya sea mieloide o linfoide.



**Figura 2.** Células involucradas en la respuesta inmune. Adaptada y modificada de *Madigan, M. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos.*

### 3.2. Tipos de inmunidad

La respuesta inmune se puede dividir en dos grandes categorías:

- **Inmunidad innata:** Es aquella que actúa inmediatamente, no depende del tipo de antígeno y no tiene memoria.
- **Inmunidad adquirida:** Depende del tipo de antígeno, y se caracteriza por ser específica, poseer memoria y puede generar tolerancia. (2)

### 3.2.1. Sistema Inmune Innato

También llamada natural o espontánea aporta la primera línea de defensa frente a una infección provocada por un microorganismo o sustancia extraña. Se caracteriza por no tener memoria, es decir, que no se verá amplificada ante un segundo contacto.

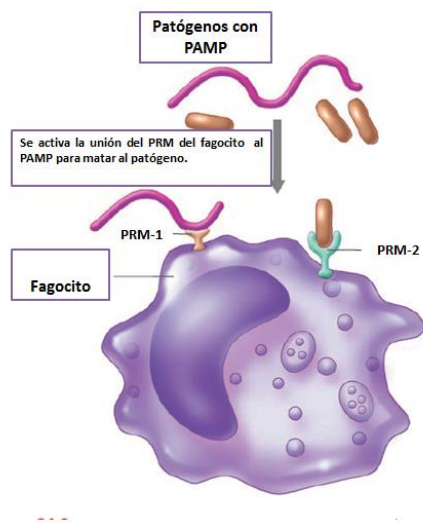
El componente más básico de la inmunidad innata está conformado por barreras físicas y químicas que impiden el acceso del antígeno al cuerpo de un individuo. La piel es la primera barrera física a vencer, ya que por su naturaleza resulta impermeable a la mayoría de agentes infecciosos. La segunda barrera que se presenta es de naturaleza química entre las que encontramos: mucosas presentes en tracto digestivo, respiratorio, vaginal y rectal, así mismo, la lisozima presente en las secreciones lagrimales, el ácido gástrico, sudor, saliva y la acción ciliar; debido a dichas barreras el sistema inmune innato es capaz de reaccionar de manera inmediata y eficiente para servir de contención ante un patógeno o sustancia extraña.

Al entrar un antígeno al cuerpo las principales células en actuar son las fagocíticas (granulocitos, macrófagos y células dendríticas) presentes en ganglios linfáticos y el bazo; las cuales por medio de receptores conocidos como *receptores de reconocimiento de moléculas* (PRM) reconocen estructuras comunes a microorganismos, estas estructuras reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), las cuales siempre se localizan en la superficie del microorganismo invasor. (1-4)

Cada receptor de un fagocito humano reconoce un PAMP específico. La interacción de un PAMP con el PRM del fagocito activa un proceso de endocitosis, desencadenando una señal a través de la membrana celular, tras lo cual se fusiona con los granulocitos transcribiendo proteínas celulares en el mismo, dicho proceso conduce a la producción de compuestos tóxicos de oxígeno (peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ), ácido hipocloroso (HClO) y oxígeno molecular ( $O_2$ ) y de nitrógeno (óxido nítrico (NO)), que son dirigidos a la pared y membrana celular de microorganismos invasores

conduciendo a un proceso de degradación. Entre los PRM más conocidos se encuentran los receptores tipo Toll (TLR).

Los receptores TLR son proteínas; se han descrito a la fecha 13 tipos. Los TLR 3, 7, 8 y 9 representan a una subfamilia que reconoce ácidos nucleicos virales y bacterianos, mientras que lo TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 y 12 reconocen principalmente componentes de bacterias, parásitos y hongos. Un claro ejemplo de esto es el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS), un PAMP presente en la membrana externa de bacterias Gram negativas, por TLR-4 un PRM de los fagocitos humanos. (1-3)



**Figura 3.** Simplificación del proceso de inmunidad innata. Adaptada de *Madigan, M. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos.*

Además de las barreras físicas y químicas, así como de las células fagocíticas, existen otros componentes que juegan un rol importante en la inmunidad innata, por lo cual se discuten a continuación:

**Péptidos antimicrobianos (PAM).** Son moléculas producidas por células epiteliales y queratinocitos, que mantienen intactas las barreras de la piel y mucosas. Un ejemplo de ellas son las defensinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$  que básicamente se encargan de reclutar linfocitos T, células dendríticas y neutrófilos.

**Sistema del complemento:** Son proteínas que circulan inactivas en el plasma, sintetizadas en el hígado y por macrófagos. Posee 3 vías de activación: vía clásica, alterna y de las lectinas. Sus funciones principales son: aumentar las respuestas de anticuerpos (Ac) y la memoria inmunitaria, llevar a cabo la lisis de células extrañas y eliminar complejos inmunitarios y células apoptóticas.

**Células dendríticas (CD).** Juegan un papel importante en la eliminación de patógenos, el control de la inmunidad y la tolerancia. Se encargan de recorrer el organismo en busca de organismos o toxinas peligrosas; ellas al fagocitar un invasor lo destruyen en pequeños fragmentos y los llevan a los ganglios linfáticos más cercanos donde se lo presentan a los linfocitos T, debido a ello son un elemento crucial en el paso de la inmunidad innata a la adquirida. (3)

### **3.2.2. Sistema Inmune Adquirido**

Los patógenos han desarrollado estrategias por medio de mutaciones, que les permiten evadir a nuestro sistema inmune innato, por lo tanto, nuestro cuerpo necesita diseñar mecanismos de protección dirigidos individualmente contra cada uno de ellos; a este proceso se le conoce como mecanismos del *sistema inmune adquirido* en el cual la velocidad y eficiencia incrementan dependiendo del número de exposiciones al mismo patógeno, a esto le llamaremos entonces *memoria inmunológica*. (1)

Este sistema conforma la segunda línea de defensa de nuestro cuerpo, aunque es importante recalcar que su activación no es tan rápida a comparación del innato, ya que puede requerir de varios días. Las principales células del sistema inmunitario adaptativo son los linfocitos B y T, las células presentadoras de antígenos y las células efectoras. Todas ellas circulan a través de la sangre y la linfa y se concentran en el brazo, ganglios linfáticos y otros tejidos.

Las características de la respuesta inmunitaria adaptativa son fundamentales para que el sistema inmunitario cumpla sus funciones, las cuales se resumen en la siguiente tabla:

<b>Tabla 1. Características principales de la respuesta inmune adquirida. Fuente:</b> Abbas, Abul K. (2008), <i>Inmunología celular y molecular</i> , 6ª ed., Elsevier.	
<b>Característica</b>	<b>Importancia funcional</b>
<b>Especificidad</b>	Garantiza que los distintos antígenos despierten respuestas específicas.
<b>Diversidad</b>	Responde a una gran variedad de antígenos.
<b>Memoria</b>	Amplifica la respuesta después de repetirse la exposición al mismo antígeno.
<b>Expansión clonal</b>	Aumenta la cantidad de linfocitos específicos de un antígeno para igualar el ritmo de crecimiento.
<b>Especialización</b>	Genera respuestas óptimas de defensa.
<b>Contención y homeostasis</b>	Responde al contacto de antígenos nuevos.
<b>Reactividad frente al huésped</b>	Evita la autolesión durante la respuesta a un antígeno extraño.

La inmunidad adquirida se clasifica en dos categorías: la inmunidad humoral y la celular; ambas proveen protección y poseen memoria.

### **3.2.2.1. Inmunidad Celular**

Es llevada a cabo por células altamente especializadas, denominadas células T o también conocidas como *Linfocitos T*, los cuales reconocen los antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos. Existen a su vez dos tipos de inmunidad celular:

- **Inmunidad activa.** Resulta de la exposición a un antígeno extraño y da como resultado la obtención de una inmunidad protectora conferida por anticuerpos y células T.
- **Inmunidad pasiva.** Donde una persona adquiere inmunidad mediante el paso de suero o de linfocitos desde otra persona con una inmunidad específica, es decir, el individuo receptor adquiere inmunidad sin haber



estado expuesto previamente al antígeno. Un claro ejemplo de este proceso es la transferencia de anticuerpos maternos al feto, lo que permite al recién nacido combatir infecciones antes de adquirir la capacidad para producirlas por sí mismo.

Los linfocitos T reconocen los antígenos de microorganismos intracelulares y sirven para destruirlos. Expresan en su superficie el receptor de T (TCR), el cual es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas alfa y beta. El TCR posee una región transmembranal anclada a la membrana, una cola citoplasmática corta y una región extracelular, esta región le da la diversidad para unirse con los diferentes antígenos.

Estos linfocitos presentan una especificidad restringida, es decir, que solo se asocian con un tipo de antígenos del tipo polipeptídico; después de unirse a unas proteínas del huésped por genes pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad (CPH), por consiguiente, reconocen y responden a los antígenos asociados a una superficie celular, pero no a los solubles.

A su vez los linfocitos T se conforman por diferentes poblaciones de acuerdo a su función: Linfocitos T cooperadores y los Linfocitos T citotóxicos o citolíticos.

El Linfocito T cooperador (Th) es identificado por la proteína específica de membrana CD4 (Linfocitos T CD4+). A su vez se subdivide en células Th1, las cuáles activan a los macrófagos y a otros fagocitos inespecíficos mediante la secreción de citocinas como interferón gama (IFN- $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); asimismo activan a las células Th2, que colaboran con los linfocitos B para producir sus anticuerpos.

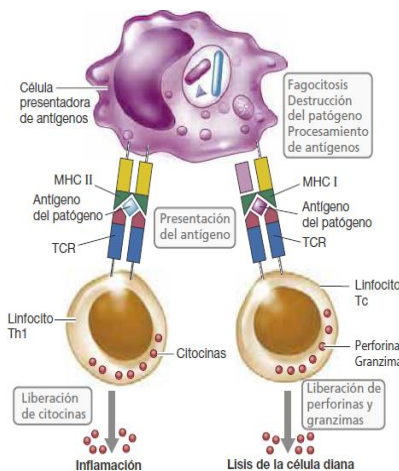
Por otra parte, los linfocitos T citotóxicos (Tc), se identifican por la proteína específica de membrana CD8 (linfocitos CD8+). Este tipo se especializa en la neutralización de células infectadas por microorganismos intracelulares mediante un ataque directo a las células infectadas y lo hacen mediante la segregación de

una proteínas llamadas *citocinas* como granzimas y perforinas que provocan su destrucción, dicho proceso se lleva a cabo a través de su receptor TCR.

En resumen, sus funciones consisten en poner en marcha la proliferación y la diferenciación de los propios linfocitos T y activar diversas células, tales como los Linfocitos B, macrófagos y otros leucocitos.

Finalmente hay un tipo especial de linfocitos, denominados *natural killer* (NK), los cuáles poseen receptores inespecíficos de membrana, que reconocen células infectadas por virus, células tumorales y células recubiertas por anticuerpos en un mecanismo que recibe el nombres de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (CCDA). Su mecanismo de acción es parecido al de los linfocitos CD8, excepto que estos no requieren de presentación de antígeno, ya que atacan directamente a las células diana.

Existen también otros linfocitos denominados T reguladores, que básicamente sirven para inhibir las respuestas inmunitarias. (1-4)



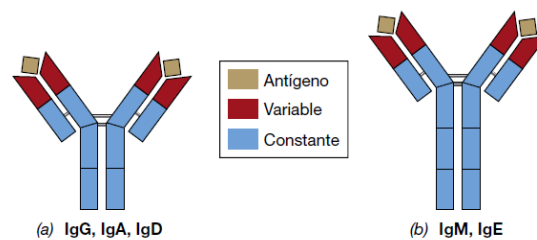
**Figura 4.** Inmunidad de células T. Adaptada de *Madigan, M. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos.*

### 3.2.2.2. Inmunidad Humoral

Los linfocitos B son las únicas células que van a producir unas glicoproteínas denominadas inmunoglobulinas (Ig).

Estos linfocitos reconocen los antígenos extracelulares incluso sobre su propia superficie y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, por lo que actúan como mediadores de la inmunidad humoral. Cada célula B posee en su superficie hasta 500,000 receptores de antígeno.

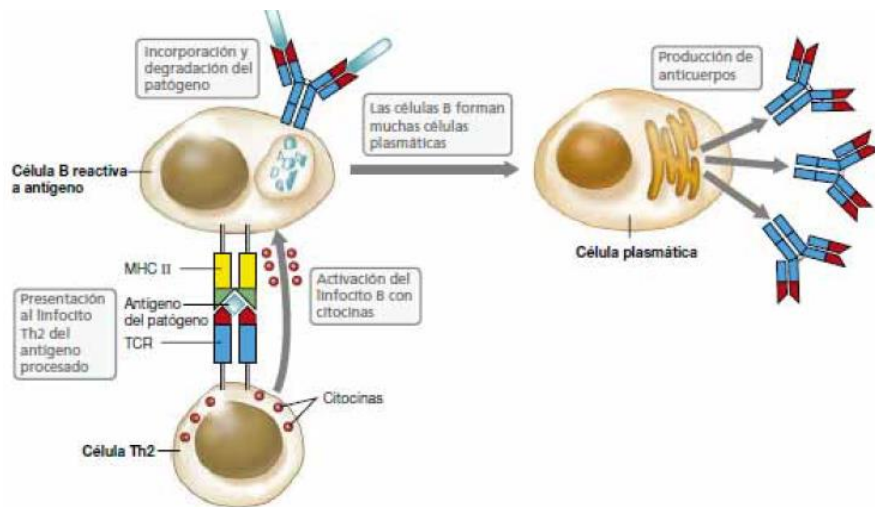
Los anticuerpos son glicoproteínas que poseen una región transmembranal y cuatro cadenas de polipéptidos, dos son cadenas pesadas idénticas y dos son ligeras. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estos tienen una región constante (Fc) y una región variable (Fab).



**Figura 5.** Clases de inmunoglobulinas. Todas las clases de inmunoglobulinas tienen dominios  $V_P$  y  $V_L$  que se unen a los antígenos. (a) La IgA y la IgD tienen tres dominios constantes. (b) Las cadenas pesadas de las IgM e IgE tienen un cuarto dominio constante. *Adaptada de Madigan, M. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos.*

Son moléculas que distinguen estructuras tridimensionales y su unión es reversible; cada antígeno tiene diferentes estructuras que son las que se reconocen para iniciar una respuesta por parte de los anticuerpos a estos elementos se les denomina determinantes o epítomos.

Todos los anticuerpos producidos por un linfocito B son específicos para un solo antígeno y se sitúan en la membrana de las células B, actuando como un receptor específico (BCR). Estos anticuerpos una vez secretados se unirán a la región *Fab* y por medio de la región *Fc* activarán el sistema del complemento (vía clásica) y a las células fagocíticas para destruir al patógeno invasor. (2,3)



**Figura 6.** Inmunidad mediada por anticuerpos. Adaptada de *Madigan, M. T. et al. Brock. Biología de los Microorganismos.*

#### Capítulo 4. Vacunas

Una de las formas para inducir artificialmente inmunidad frente a enfermedades infecciosas, es exponiendo al individuo deliberadamente a dosis controladas de una molécula capaz de interactuar con componentes específicos del sistema inmunitario, es decir, a un antígeno, con el fin de que este produzca anticuerpos; a este proceso se le conoce comúnmente como vacunación.

La vacunación es considerada uno de los mayores logros en salud pública del siglo XX, ya que se logró disminuir significativamente la morbilidad y la mortalidad global causada por una serie de infecciones como la viruela, poliomielitis, sarampión, hepatitis B, etc.

Una vacuna puede definirse como un preparado biológico que induce una inmunidad frente a una enfermedad concreta, para la que ha sido diseñada, desde el punto de vista de la inmunología es un antígeno o mezcla de ellos que se utiliza para inducir una inmunidad artificial. (2)

Así con base a lo anterior tras la administración de una vacuna se pretende simular la invasión de un organismo patógeno y servirse así, de la capacidad de este para responder de modo más rápido y eficaz ante antígenos que ya han sido

reconocidos previamente. De esta forma los elementos biológicos de la vacuna son reconocidos vía receptores del sistema inmune innato, con lo que se desencadena una respuesta coordinada, que bien puede ser humoral, celular o ambas, y que conduce a la eliminación de estos, no sin antes formarse células de memoria. La inducción de la memoria junto con anticuerpos de larga duración contra un patógeno, es el objetivo final de la vacunación.

#### 4.1. Composición

En si una vacuna es una formulación a base de ciertos componentes, donde cada uno de ellos tiene un propósito específico, por ejemplo: pueden ayudar a proporcionar inmunidad contra una enfermedad específica, ayudar a mantener la seguridad y larga duración de la vacuna, e incluso solo utilizarse durante la producción de la misma.

<b>Tabla 2. Componentes de una vacuna.</b> Fuente: <a href="https://www.hhs.gov/es/immunization/basics/types/index.html">https://www.hhs.gov/es/immunization/basics/types/index.html</a>		
<b>Compuesto</b>	<b>Función</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Antígeno</b>	Componente activo que genera la respuesta inmune	Proteínas, toxinas, organismos en su forma activa o inactiva.
<b>Adyuvante</b>	Mejora la respuesta inmunitaria a la vacuna.	Sales de aluminio
<b>Conservador/ Preservativo</b>	Proteger ante una contaminación por parte de bacterias y hongos.	2- fenoxietanol
<b>Estabilizante</b>	Evita reacciones químicas, así como la separación de los componentes de la vacuna	Lactosa, sucrosa, glicina, gelatina, albumina humana recombinante.
<b>Surfactante/ Tensoactivo</b>	Mantiene todos los componentes en contacto, además de evitar la sedimentación y aglomeración de componentes en forma líquida dentro de la vacuna.	Polisorbato 80 (Tween 80), Trioleato de Sorbitano 85 (Span 80).
<b>Diluyente</b>	Diluir antes de la aplicación.	Agua estéril

## 4.2. Tipos de vacunas

Con base a la naturaleza del antígeno, existen cuatro tipos de vacunas, que se describen a continuación:

**Vacunas vivas atenuadas.** El agente biológico que las constituye es el patógeno atenuado. Su ventaja principal es su alta capacidad para activar de forma eficiente el sistema inmune al existir una buena presentación antigénica e inducción de la respuesta humoral como celular. Dado que estas vacunas son tan similares a la infección natural que ayudan a prevenir, crean una respuesta inmunitaria rápida, fuerte y de larga duración. Desde el punto de vista socioeconómico su producción es económica, se pueden administrar mediante vías accesibles como intramuscular y subcutánea, sin embargo, también presentan algunas limitaciones como el almacenamiento ya que deben mantenerse en cadena de frío, por lo que evidentemente pueden no ser de fácil acceso para ciertas poblaciones. Las vacunas vivas se han utilizado para proteger contra enfermedades como la varicela, rubeola, paperas, sarampión, viruela y rotavirus.

**Vacunas inactivadas.** Formadas por el patógeno inactivado, proteínas y polisacáridos. La inactivación se realiza mediante calor o productos químicos, lo que hace que pierdan la capacidad para dividirse y producir la enfermedad. Si bien estas vacunas son más seguras que las anteriores, la activación de la respuesta inmune es limitada. Básicamente estas activan la respuesta inmune innata solamente en el lugar de inyección, es decir a nivel local, por lo que la vía de administración juega un papel importante. Por lo anterior se requiere de la presencia de adyuvantes específicos que van a inducir y proporcionar la suficiente activación de las células inmunitarias. Estas se han usado para el tratamiento de enfermedades como hepatitis A, rabia, poliomiелitis e influenza.

**Vacunas de subunidades, recombinantes.** En lugar del patógeno completo, solo incluyen los componentes, o antígenos, que mejor estimulan el sistema inmunitario. Se pueden utilizar proteínas antigénicas aisladas o virus-like particles (cápside del virus sin ácido nucleico en su interior). Aunque este diseño puede

hacer que las vacunas sean más seguras y fáciles de producir, a menudo requiere la incorporación de adyuvantes para provocar una fuerte respuesta inmunitaria protectora porque los antígenos por sí solos no son suficientes para inducir una inmunidad adecuada a largo plazo, ya que carecen de capacidad replicativa, además de solo desencadenar respuesta del tipo humoral. Usadas en el tratamiento de virus del papiloma humano (VPH), tosferina, hepatitis B y neumococo.

**Vacunas de DNA.** Formadas por secuencias de material genético (DNA) que codifican el antígeno o antígenos contra los que se busca una respuesta inmunitaria. Las propias células del cuerpo luego usan este material genético para producir los antígenos. Con estas se consigue la estimulación de amplias respuestas inmunitarias a largo plazo, excelente estabilidad de la vacuna y relativa facilidad de fabricación de vacunas a gran escala. Sin embargo, muchas de estas vacunas están en proceso de investigación, y por el momento ninguna está autorizada para uso humano. (5-8)

### **4.3. Producción de vacunas**

Todas las vacunas deben cumplir con dos elementos esenciales: ser inmunogénicas y ser producidas en un estado altamente purificado y seguro para ser administradas.

Por lo general su producción se da por fermentación a gran escala y en lo que refiere a las células, sus productos internos o secreciones extracelulares son purificadas después de la fermentación. Los tipos de vacunas de mayor utilización son las purificadas de embrión de pollo y las de cultivo celular. (9)

#### **4.3.1. Embrión de pollo**

Al embrión de pollo también se le conoce como *tubo de cultivo de tejido natural* y ha sido utilizado en gran escala por la industria farmacéutica para vacunas como: rubeola, sarampión, influenza, varicela y la rabia. En el huevo de pollo se identifican las siguientes zonas. (Fig.7.)

**Cámara de aire.** Es el espacio localizado en el polo mayor del huevo y su función está relacionada con la respiración y ajustes de presión.

**Cavidad alantoidea.** Funciona como depósito de los desechos del metabolismo del embrión.

**Embrión.** Se encuentra dentro de la cavidad amniótica.

**Membrana corioalantoidea.** Ayuda al embrión a obtener el oxígeno y el calcio suficientes para su desarrollo.

**Saco amniótico.** Rodea al embrión, contiene el líquido amniótico que sirve como protección del embrión frente a daños físicos, así como de intercambio de moléculas.

**Saco vitelino.** Esta unido al embrión y contiene el vitelo rico en nutrientes.



**Figura 7.** Embrión de pollo. Adaptada y modificada de [https://weblab.deusto.es/olarex/cd/UD/Incubator\\_ES\\_final/desarrollo\\_embionario.html](https://weblab.deusto.es/olarex/cd/UD/Incubator_ES_final/desarrollo_embionario.html)

Para considerar la inoculación de virus en el embrión se deben considerar factores como la edad del embrión, la vía de inoculación, la concentración del virus, la temperatura y período de incubación.

El embrión de un pollo de 6 o 7 días de edad está lo suficientemente desarrollado como para que se desarrolle la multiplicación del virus.

Algunas de las ventajas del porque usarlo en vacunas es que se puede disponer de ellos fácilmente, son fáciles de manipular, el embrión se encuentra protegido del mundo exterior lo que asegura su esterilidad y estar libre de contaminación bacteriana u otro patógeno, poseen células muy indiferenciadas y por tanto varios



virus pueden crecer en ellos y una de las más importantes es que carecen de respuesta inmunitaria que podrá eliminar al virus.

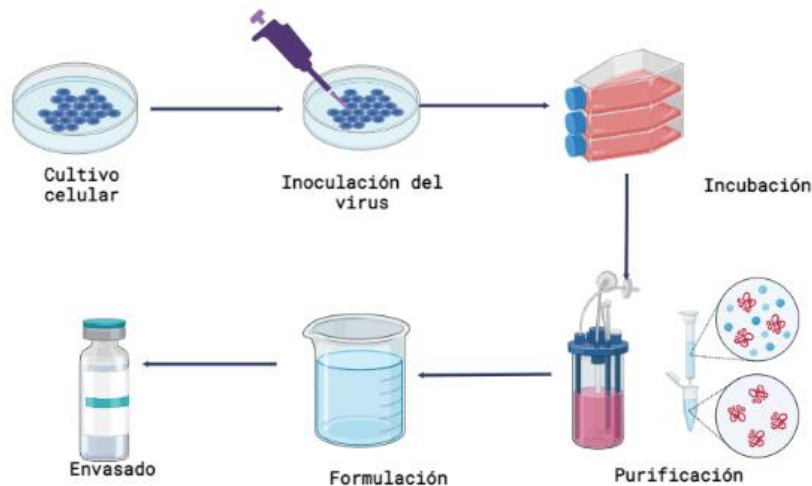
En lo que refiere a desventajas se encuentran: el sitio de inoculación y la edad del embrión, ya que este varía con diferentes virus, existe una variabilidad individual, es una técnica que consume mucho tiempo y por último durante su fabricación queda como contaminante la ovoalbúmina, la cual puede presentar en la persona inoculada una reacción alérgica. (9,10)

#### **4.3.2. Cultivo celular**

La utilización de cultivos celulares como sistemas de producción de biológicos y procesos de aislamiento ofrecen una buena alternativa comparado con el proceso realizado en huevos embrionados.

Su principal ventaja radica en la capacidad de ofrecer una mayor sensibilidad al brindar las condiciones necesarias para el crecimiento *in vitro* de virus, además de reducir los riesgos de contaminación microbiológica y prevenir la presentación de reacciones alérgicas que podrían ser inducidas por la presencia de componentes proteicos provenientes del huevo.

Este proceso de inoculación consiste primero en realizar la disgregación celular ya sea por métodos enzimáticos o mecánicos, lo que lleva a la pérdida de las interacciones célula-célula y las célula-matriz extracelular, sin embargo, estas son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente; finalmente, cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia, aquí las células establecen contacto entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene; por eso, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte, esta operación se denomina subcultivo o pase. (**Fig.8.**)



**Figura 8.** Proceso de fabricación de una vacuna en cultivo celular. *Adaptado y modificado de <https://www.vacunas.sanofipasteur.es/quienes-somos/fabricacion>*

Uno de los cultivos celulares usados en la producción de vacunas es el primario, entre los que se encuentra los siguientes:

**Cultivos en monocapa.** Aquí las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). En este se requiere el anclaje del sustrato para que ocurra la proliferación celular.

**Cultivos en suspensión.** Donde las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo y su crecimiento no depende del anclaje.

Las vacunas en suspensión permiten un escalamiento industrial debido a que precisamente no requieren de un anclaje y que permiten el uso de medios químicos definidos, lo cual elimina riesgos potenciales como la variación entre lotes y el riesgo potencial de contaminación con micoplasma, virus o priones, lo que en conjunto reduce los costos de producción.

Sin embargo, ambos cultivos, presentan desventajas tales como: el riesgo de contaminación con microorganismos adventicios, el alto costo de mantenimiento y suplementación del medio. Así mismo, las tasas de recuperación de partículas virales pueden ser menos eficientes comparadas con las de la línea celular continua.

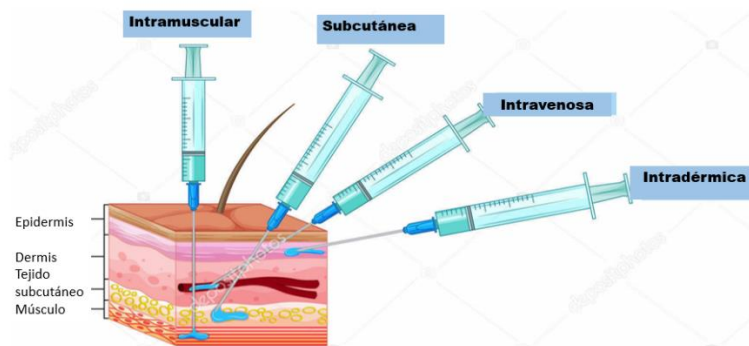
La línea celular establecida, es el otro cultivo utilizado en vacunas, el cual se caracteriza por presentar una vida media infinita, facilitar la generación de clones,

y adaptarse a condiciones de crecimiento en un medio de cultivo en particular, además de ofrecer la posibilidad de documentar fácilmente su historial.

Entre las desventajas de la elaboración de vacunas derivadas de cultivos celulares se encuentra el potencial de formación de tumores por residuos como proteínas y DNA derivados de la línea celular empleada. (9,11,12)

#### 4.4. Vías de administración

La mayoría de las vacunas disponibles para ser utilizadas en seres humanos, se administran mediante la vía parenteral, siendo las más comunes la vía subcutánea intradérmica y la intramuscular. La inmunogenicidad generada dependerá del tipo de vacuna y del adyuvante empleado. (Fig.9.)



**Figura 9.** Vías de administración de vacunas parenterales. Adaptada y modificada de <http://www.atensalud.com/2017/04/farmacologia-geriatrica-la-via.html>

La inmunización intradérmica es con la que se obtiene mayor respuesta inmunitaria, debido a la alta concentración de células dendríticas en la dermis que se encargan de atrapar el antígeno vacunal, aunado a que existe una mayor inflamación local que conduce a una maduración rápida, así como a una migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos.

Se ha recomendado el uso de la vía intramuscular para la aplicación de vacunas inactivadas con adyuvantes en lugar de la subcutánea debido a la presencia de irritación, dolor local e incluso por la formación de granulomas.

De manera general por la vía parenteral, la primera señal de activación que se produce en el sistema inmune es con la inyección, ya que produce un daño en el epitelio afectando la piel; de ahí el proceso continua con la liberación de alarminas

como las defensinas, quienes actúan como mediadores quimiotácticos atrayendo hacia el sitio de la inyección a las células dendríticas, estas actuarán como CPA's que capturarán al antígeno y posteriormente lo llevarán hacia los ganglios linfáticos, donde se presentarán a los linfocitos T CD4+, que van a evolucionar a linfocitos T efectores los cuales al activarse migrarán hacia el sitio de infección y ahí comenzarán a liberar citocinas que actúan como mensajeros intercelulares, activando también linfocitos Tc, células NK, macrófagos, etc. También los linfocitos T migrarán hacia zonas de linfocitos B presentes en ganglio, para activarlos. (1)

En las últimas décadas la vía mucosa ha saltado a la vista como una interesante alternativa para administrar vacuna, lo cual se debe a que la mayoría de las infecciones tanto bacterianas como virales tienen lugar a través de las membranas mucosas, al ser el primer punto de contacto con el ambiente externo, recordando que tenemos mucosas presentes a nivel del tracto respiratorio, lagrimal, urogenital e intestinal, que al final abarcan una gran área de superficie en el cuerpo humano. La superficie mucosa está protegida por células pertenecientes tanto al sistema inmune innato como el adaptativo. La inmunización mediante las mucosas ocurrirá principalmente por el MALT el cual contiene células B, células T y CPA's, siendo estas últimas de vital importancia ya que le atribuye el potencial de iniciar una respuesta inmune mediada por células de memoria.

Este tejido se encuentra cubierto por folículos asociados al epitelio, células epiteliales y linfoides; así mismo se encuentra protegido por anticuerpos siendo la inmunoglobulina secretada IgA la más abundante.

La vacunación a nivel de mucosas ha reportado grandes ventajas como:

- Generar una respuesta inmune sistémica como a nivel de mucosas
- Alta conformidad por parte del paciente, al ser una forma libre de agujas.
- Fácil de administrar.
- Gran área de superficie de aproximadamente 400 m<sup>2</sup>
- No requerir de personal altamente calificado para su administración

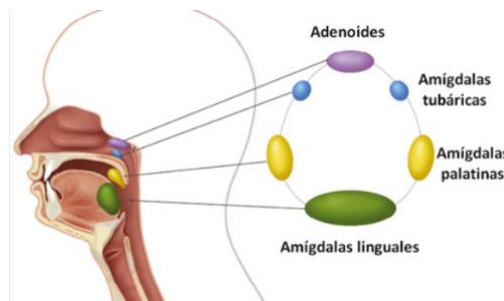
Es así que, dentro de las posibilidades para realizar una vacunación a nivel de mucosas, la cavidad nasal es uno de los sitios más prometedores para llevarla a cabo.

La mucosa nasal suele ser el primer punto de contacto para los antígenos inhalados y desde el punto de vista inmunológico ha sido descrita como una de las regiones más importantes dentro de la cavidad nasal para inducir una respuesta tanto local como sistémica, aunado a ello es una vía de fácil acceso, altamente vascularizada, provee una gran superficie de absorción, es una vía no invasiva, pues no requiere de agujas para administrarse y la dosis administrada puede ser menor, debido a una baja actividad enzimática en comparación con la vía oral.

Es importante destacar que al administrar una vacuna debemos tener en cuenta como es la naturaleza del antígeno, así como su interacción con la mucosa, además de factores como la dosis, uso de adyuvante, la frecuencia de administración e incluso factores genéticos; los cuales en conjunto van a determinar qué tipo de respuesta inmune se obtendrá.

El inicio del mecanismo de acción inmunitario considera como primer paso hacia la obtención de una respuesta inmune que el antígeno debe alcanzar el tejido linfoide asociado a nariz (NALT).

NALT es uno de los componentes del MALT, su funciones radican en proteger el epitelio nasal de la colonización de patógenos y de la entrada a antígenos inhalados, además de la producción de anticuerpos. En el caso de los seres humanos este se encuentra constituido por el anillo de Waldeyer, que comprende las amígdalas palatinas, las amígdalas tubáricas y las amígdalas linguales, así como los adenoides.



**Figura .10.** Anillo de Waldeyer. Adaptada y modificada de Lobaina, Y. M. *Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities.*

La respuesta inmune generada por medio de NALT, se debe a la existencia de sitios inductivos cubiertos por un folículo especializado asociado al mismo epitelio y que contiene células microfold o células M, las cuales actúan como transportador transmembranal. de esta forma llevan y proceden a presentar al antígeno a las CPA's, lo que a su vez desencadena la activación de células dendríticas macrófagos y de las células T. Las células T a su vez estimularán a las células B para que puedan producir el anticuerpo IgA1 presente en glándulas lagrimales y en la mucosa nasal.

Como segundo paso en el mecanismo de acción se tiene que las CD maduraran y posteriormente migraran hacia los ganglios linfáticos cervicales cercanos donde se presentarán a péptidos del CPH II, quien activará a los linfocitos Th1, produciendo moléculas reactivas como el interferón gama (INF- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 12 (IL-12), y linfocitos Th CD4+. Tambien existirá una activación del CPH I el cual se encargara de producir de linfocitos Tc CD8+.

En conclusión, se tiene que la estimulación de la mucosa nasal tras la administración de una vacuna resultará en una potente respuesta inmune tanto humoral como celular, ocurriendo ambas tanto a nivel sistémico como mucoso.

Como mencione previamente la naturaleza del antígeno es un factor a considerar, ya que su interacción con el NALT y el epitelio nasal dependerá de ella. Por ejemplo, si nuestro antígeno se encuentra en forma soluble este penetrará el epitelio nasal ayudado por los excipientes utilizados en la formulación y así activará directamente a las células dendríticas, macrófagos y linfocitos; más si en cambio, si el antígeno es un sistema particulado será procesado primeramente por las células M. (13-17)

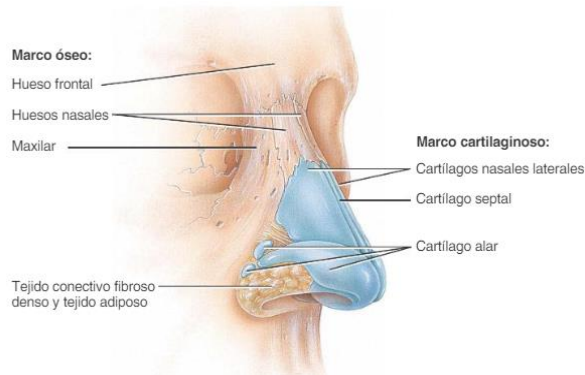
## **Capítulo 5. Vía intranasal**

### **5.1. Anatomía y fisiología nasal**

La nariz es un órgano especializado localizado en la entrada del aparato respiratorio, es la única parte externa y visible del aparato respiratorio. Se divide en nariz externa y la cavidad nasal.

### 5.1.1. Nariz externa

La anatomía nasal externa se compone de hueso, cartílago y de tejidos blandos (piel, tejido fibroadiposo y músculos controlados por nervios faciales). La parte ósea y cartilaginosa de la nariz externa construye la estructura piramidal que puede diferir mucho dependiendo de la raza.

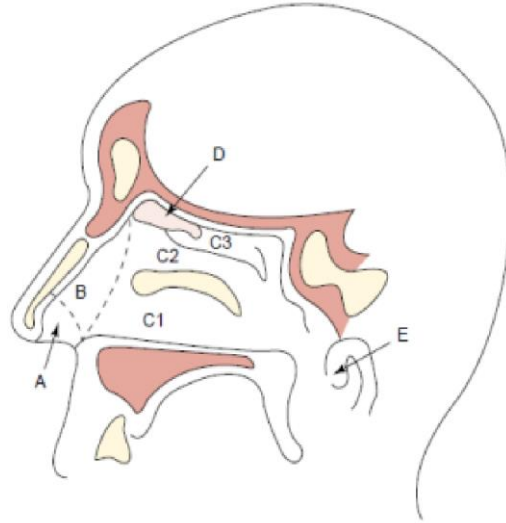


**Figura 11. Vista anterolateral de la porción externa de la nariz.** Se muestran las estructuras ósea y cartilaginosa. Adaptado de *Tortora, G. J. Principios de Anatomía y Fisiología*.

Sus funciones principales son la detección del estímulo olfatorio y la modificación de las vibraciones vocales que pasan a través de la cámara de resonancia. Aunque esta estructura puede no tener una relevancia obvia para la administración intranasal de medicamentos y vacunas, es importante considerarla para el diseño de dispositivos y para comprender las técnicas de administración. (18,19)

### 5.1.2. Cavidad nasal

Estructuralmente la nariz se divide en dos grandes cavidades, está formada por 14 huesos conectados entre sí por una membrana resistente de naturaleza fibrosa, conocida como *tabique nasal*; tiene aproximadamente 12-14 cm de largo y aproximadamente 5 cm de alto. El área total de superficie de ambas cavidades es de aproximadamente 150-200 cm<sup>2</sup>, mientras que el volumen de cada cavidad es de aproximadamente 15 mL. Está compuesta de diferentes regiones: la región vestibular, atrio, región respiratoria, región olfatoria y la nasofaringe. (20-22)



**Figura 12. Esquema de la cavidad nasal.** Región vestibular (A), Atrio (B), Región respiratoria: cornete inferior (C1), cornete medio (C2), cornete superior (C3), región olfatoria (D) y la nasofaringe (E). Adaptado de *Ugwoke, et al. Nasal mucoadhesive drug delivery.*

**Región vestibular.** Se encuentra en la abertura de las fosas nasales, con un área de sección transversal de  $0.6 \text{ cm}^2$ . Se encarga de filtrar el aire inhalado.

**Atrio.** Es la región intermedia entre la región vestibular y la respiratoria.

**Región respiratoria.** Es la porción más grande de la cavidad nasal ( $130 \text{ cm}^2$ ), abarcando del 80 al 90% del área de superficie total del epitelio nasal. Se divide en 3 secciones: cornetes inferiores, medios y superiores. Es considerada como el mejor sitio de absorción de fármacos para alcanzar la circulación sistémica

**Región olfatoria.** Con una superficie de  $10 \text{ cm}^2$  (10% del área total). Posee irrigación sanguínea, glándulas acinares secretoras (glándulas de Bowman) que están bajo el control de sistema nervioso parasimpático, linfáticas nasales y suministro neuronal que a su vez se compone de axones olfatorios, fibras nerviosas autónomas y la rama maxilar del nervio trigémino.

Funcionalmente esta se encarga de filtrar cualquier partícula o microorganismo inhalado atrapada en el vello o la capa mucosa que cubre dicha área, para posteriormente llevarlas a la parte posterior de la garganta y hacia el tracto



gastrointestinal; además de calentar y humedecer el aire inhalado antes de que llegue a los pulmones.

### **5.1.3. Epitelio nasal**

Es de naturaleza pseudoestratificada, facilita los procesos de transporte activo mediante el intercambio de agua y iones a través de las células. Es una zona altamente vascularizada por los canales de las arterias maxilares, en especial la arteria esfenopalatina.

Alrededor del 15 al 20% de las células presentes en el epitelio nasal están cubiertas con una capa móvil de *cilios* que son protuberancias similares a vellos en la superficie de la célula epitelial; hay aproximadamente de 100 a 250 cilios por célula, miden 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud, cubiertos con aproximadamente 300 microvellosidades, operan óptimamente a una temperatura entre 35 a 40 °C y pulsan alrededor de 1000 veces por minuto a una frecuencia de 12 a 15 Hz. La coordinación de estos pulsos es estimulada y controlada por señales bioquímicas. (23)

Además de la presencia de células, existen glándulas mucosas y células serosas, que en conjunto forman la capa mucosa.

La *capa mucosa* consiste en una bicapa, una capa superior de gel que flota en la solución inferior más acuosa, llamada capa líquida periciliar. Algunos investigadores describen una tercera capa compuesta de surfactantes, la cual se ubica entre ambas capas. En la siguiente tabla se resumen las funciones de cada una:

<b>Tabla 3. Funciones de los componentes de la capa mucosa.</b> Adaptado de Gizurarson, S. <i>The Effect of Cilia Clearance on Successful Drug Delivery.</i>	
<b>Componente</b>	<b>Funciones</b>
<b>Líquida Periciliar</b> (3-5 $\mu\text{m}$ de espesor)	-Es un depósito que acepta y dona líquido para mantener el funcionamiento de los cilios, además de mover la capa que contiene mucina.
<b>Surfactante</b>	-Facilita la propagación de la mucosa además de permitir que la capa de gel fluya libre hacia la faringe.
<b>Gel</b> (2-4 $\mu\text{m}$ de espesor)	Establece una capa adhesiva que atrapa partículas exógenas.

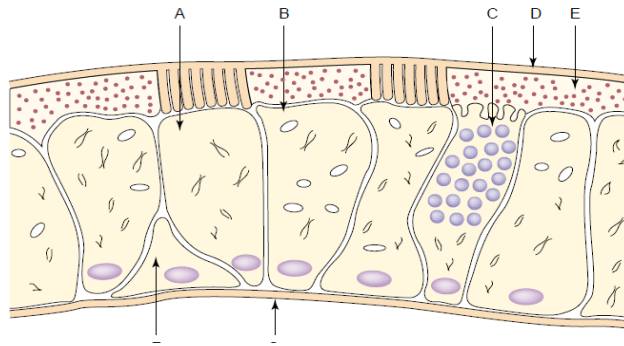
Se ha estimado que en la nariz humana hay aproximadamente 100,000 glándulas seromucosas; en las cuales alrededor de 1.5 a 2.1 mL de secreción mucosa, o también llamado *moco* se produce diariamente.

El moco es un gel viscoelástico que forma una delgada película protectora en la superficie del epitelio y tiene un grosor de entre 10 a 15  $\mu\text{m}$ .

Está compuesto por 95 % agua, 1 a 2 % de electrolitos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ), enzimas, oxidantes, 2 a 4% de glicoproteínas (mucinas), 1% de proteínas (principalmente albúmina, transferrina, lactoferrina), lípidos, células e inmunoglobulinas (IgA e IgG); además este se mueve a través de la nariz a una velocidad aproximada de 5 a 6 mm / min, lo que da como resultado que la capa mucosa se renueve cada 20-30 min, aunque estos valores varían mucho, incluso entre individuos normales. (20,23)

La mucosa es considerada un mecanismo de defensa al brindar protección del daño epitelial causado por formulaciones nasales o irritantes inhalados, lo cual lleva a cabo por sus propiedades adhesivas, que le permiten atrapar y transportar

sustancias extrañas hacia la nasofaringe; asimismo se encarga de humedecer el aire inspirado (humedad 98%, 30°C), filtrar y remover cerca del 80 al 100% de partículas ( $>4 \mu\text{M}$  de diámetro).



**Figura. 13. Estructura del epitelio nasal.** Se muestran células ciliadas (A), células no ciliadas (B), células caliciformes (C), capa de moco en gel (D), capa de moco líquida (E), célula basal (F) y membrana basal (G). Adaptado de *Ugwoke, et al. Nasal mucoadhesive drug delivery.*

La *mucina* es el mayor componente del moco, es responsable de su estructura gelatinosa, de sus propiedades viscoelásticas y de cohesión. Son glicoproteínas de alto peso molecular (hasta  $3 \times 10^6$  Da por monómero) codificadas por genes específicos de mucina (MUN), secretadas por las células caliciformes epiteliales y glándulas submucosas.

Su estructura presenta fibras filamentosas con regiones proteicas ricas en prolina, treonina y serina que se anclan por sus grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) a regiones glicosiladas ricas en carbohidratos y en residuos de cisteína; debido al contenido de ácido siálico y a que la mayoría de las regiones glicosiladas contienen grupos carboxilo o sulfato, las mucinas poseen una carga superficial neta negativa a pH fisiológico. (20,23,24) (Fig. 5)

## 5.2. Administración nasal

Tradicionalmente la razón más común de administrar medicamentos en la cavidad nasal era proporcionar una ruta conveniente y accesible para un manejo rápido y

eficiente de síntomas asociados a enfermedades locales tales como rinitis y congestión; sin embargo, en las últimas décadas, la liberación intranasal ha estado más enfocada como una atractiva alternativa para el suministro de fármacos a nivel sistémico y hacia el cerebro, además de la administración de vacunas a nivel del epitelio mucoso.

Entre las ventajas para utilizar esta vía tenemos: su gran área de superficie para la absorción de 160 cm<sup>2</sup>, ser una zona altamente vascularizada, de fácil acceso, no invasiva, evade el metabolismo de primer paso, es una zona de absorción rápida y también permite el transporte directo a circulación sistémica y al SNC.

Por el lado contrario entre sus desventajas se encuentra: un volumen restringido a administrar, compuestos de alto peso molecular no pueden ser absorbidos, el aclaramiento mucociliar, las condiciones patológicas del paciente, la actividad enzimática y la baja permeabilidad para moléculas de carácter hidrofílico.

### **5.3. Consideraciones para que ocurra la absorción**

Para que se lleve a cabo la absorción en la cavidad nasal el primer paso es que los componentes de la vacuna pasen a través de la mucosa, para lo cual deberemos de considerar las siguientes propiedades de la formulación:

**pH e irritación de la mucosa.** El pH de una formulación nasal óptima debe encontrarse en un rango de 4.5–6.5, esto con el fin de evitar irritación de la cavidad nasal. Cabe destacar que un cambio de pH ácido a alcalino contribuye a que la lisozima en la secreción nasal quede inactiva y favorezca el desarrollo de una infección. (21,22,25,26)

**Osmolaridad.** Se recomienda utilizar soluciones isotónicas para así evitar la contracción o inhibición de la actividad ciliar. La osmolaridad de las formulaciones debe encontrarse entre 285 y 310 mOsmol/L. (21,22,25,26)

**Viscosidad.** A mayor viscosidad, la formulación incrementa el tiempo de contacto en la mucosa nasal, lo que trae como consecuencia una reducción en el goteo

post-nasal y un favorecimiento de la absorción y permeación. Formulaciones altamente viscosas interfieren con las funciones normales como el latido ciliar y el aclaramiento mucociliar. (21,22,25)

**Dosis y volumen de dosis.** Estos son dos parámetros interrelacionados que afectan la absorción nasal:

- Dosis terapéutica: límite superior  $25 \frac{mg}{dosis}$  y un volumen de 25 a 200  $\frac{\mu L}{fosa\ nasal}$
- Volumen: Se puede administrar de 0.05 a 0.15  $\frac{mL}{dosis}$ . (25).

**Excipientes.** Deben ser seleccionados en base a sus funciones y no deben ser tóxicos para la mucosa nasal. Entre algunos de los excipientes más usados en las formulaciones nasales se encuentran solubilizantes (emulsificantes y agentes suspensores), antioxidantes, conservadores, humectantes y agentes de gelificación o modificadores de la viscosidad.

**Peso molecular.** Es el mayor limitante, se ha reportado una correlación lineal inversa entre la absorción y un peso molecular mayor a 300 Da. La absorción disminuye significativamente si el peso molecular es superior a 1000 Da, por lo general estas requieren la ayuda de potenciadores de absorción, algunos ejemplos de ellos son surfactantes, glicoles, glicósidos y ciclodextrinas. Fisher et al; concluyó que moléculas con pesos moleculares menores a 300 Da no se ven afectadas por las propiedades fisicoquímicas como son peso molecular, tamaño, pH de la formulación y pka. (21)

**Tamaño de partícula.** El tamaño de la partícula debe ser mayor a 10  $\mu m$  para que se deposite en la cavidad nasal. (21)

**Rango de solubilidad y disolución.** Para que una molécula sea absorbida se requiere que este disuelta en las secreciones nasales para evitar ser eliminado por el aclaramiento mucociliar disminuyendo su biodisponibilidad. (21,25)

**Lipofilicidad.** Los compuestos lipofílicos atraviesan fácilmente las membranas biológicas mediante la ruta transcelular, mientras que los hidrofílicos no lo hacen, por lo tanto, al incrementar la lipofilia se aumenta la permeación a través del epitelio. (22,25)

**Efecto de la deposición.** Cuando la formulación se deposita en la porción anterior de la nariz proporciona un tiempo de residencia más largo y con ello una mejor absorción, mientras que si es depositada en la porción posterior el fármaco será eliminado y por lo tanto tendrá una residencia más corta en la cavidad nasal. (8)

**Efecto de la actividad enzimática.** La biodisponibilidad de proteínas y péptidos pueden verse limitada por la presencia de enzimas en la cavidad nasal, las cuales son responsables de la degradación de fármacos, lo que trae como resultado la creación de un pseudo efecto de primer paso. En la mucosa nasal han sido identificadas epóxido hidrolasas, carboxilesterasas, aldehído deshidrogenasas, glutatión S-transferasas, citocromo P-450. Se ha reportado que la insulina y desmopresina son sujetos de degradación de proteasas y peptidasas. (26)

**Condiciones patológicas.** Infecciones virales y bacterianas, cirugía nasal, rinitis alérgica y poliposis nasal, comúnmente son asociadas con una disfunción en el aclaramiento mucociliar, lo que trae como consecuencia: hipo o hipersecreciones, irritación de la mucosa nasal, alteración en el pH, así como una afectación en el transporte mucociliar y/o en la capacidad de absorción nasal de fármacos o vacunas. (21,25)

**Aclaramiento mucociliar.** Es un mecanismo de defensa que se encarga de eliminar partículas inhaladas, tales como: bacterias, virus, alérgenos y toxinas, etc.; cuando estas sustancias son atrapadas en el moco ya sea disueltas o adheridas, las células ciliadas se encargan de transportarlas hacia la nasofaringe, para eventualmente descargarlas en el tracto gastrointestinal, a este proceso se le conoce como *aclaramiento mucociliar*.

Se lleva a cabo debido a una interacción coordinada entre la capa mucosa suprayacente y el movimiento metacrónico ondulatorio de los cilios subyacentes.

En el caso de formulaciones administradas en la cavidad nasal, el aclaramiento ocurre debido a un hinchamiento de la capa mucosa como consecuencia de la interacción entre cilios y moco; resultando en una remoción de la misma en aproximadamente 21 minutos. Por lo tanto, el aclaramiento mucociliar está

inversamente relacionado con el tiempo de residencia y, por lo tanto, inversamente proporcional a la absorción del fármaco administrado. (20-22)

#### **5.4. Mecanismos de permeación**

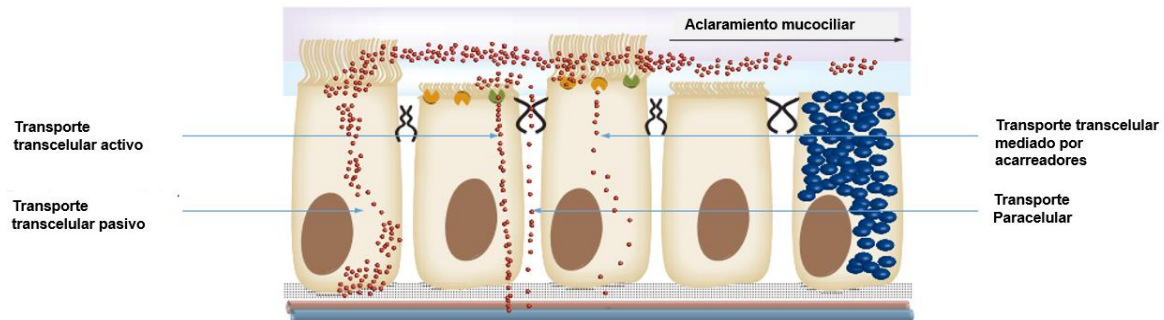
Un fármaco administrado en la cavidad nasal puede atravesar la mucosa mediante diferentes mecanismos de permeación entre los que encontramos el transporte *transcelular* y *paracelular*. (Figura 15)

**Transporte transcelular.** Involucra el paso de moléculas a través de la membrana apical, el espacio intracelular y las células basolaterales antes de entrar a la circulación sistémica, básicamente esta ruta es utilizada por moléculas de naturaleza lipofílica, el cual puede ocurrir por 3 diferentes procesos:

- 1. Difusión pasiva.** Es el principal mecanismo de permeación de solutos a través del epitelio nasal, involucra la partición de moléculas de fármaco en la bicapa lipídica celular y su posterior difusión a través del citoplasma. Se produce a favor de un gradiente de concentración y sin gasto energético. Se sabe que, a mayor concentración, mayor velocidad hasta que se igualen las concentraciones en ambos lados de la membrana. Es un mecanismo no saturable.
- 2. Transporte mediado por acarreadores.** En el caso de la mucosa nasal las proteínas transportadoras transmembranales experimentan cambios conformacionales que ayudan a que moléculas grandes atraviesen la membrana celular. Funciona por un gradiente de concentración llevándolo de una alta a una de baja concentración; es energéticamente independiente (pasivo) o dependiente de energía (activo), es saturable y puede ser inhibido competitivamente por compuestos que interactúen con el acarreador.
- 3. Endocitosis.** La molécula se envuelve dentro de una vesícula.

**Transporte paracelular.** En este las moléculas se transportan a través de las uniones estrechas entre las células del epitelio por medio de una difusión simple o

por arrastre de un disolvente. Es utilizado por moléculas de naturaleza hidrofílica y de bajo peso molecular menor a 1000 Da. (25-27)



**Figura.14.** Mecanismos de permeación del fármaco a través del epitelio nasal. Adaptado de Remigius, A. *Challenges in nasal drug absorption: how far have we come.*

## 5.5. Mucoadhesión

En las dos últimas décadas el concepto de mucoadhesión empezó a generar interés en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas debido a las ventajas que ofrecen, destacándose la capacidad de prolongar el tiempo de residencia en el sitio de acción obteniendo como resultado una mayor absorción que se ve reflejado en el paciente en una potenciación del efecto.

El término *bioadhesión* puede ser definido como el estado en que 2 materiales, uno de naturaleza biológica, se mantienen unidos durante largos periodos de tiempo por fuerzas interfaciales. En los sistemas biológicos, la bioadhesión puede ser clasificada en:

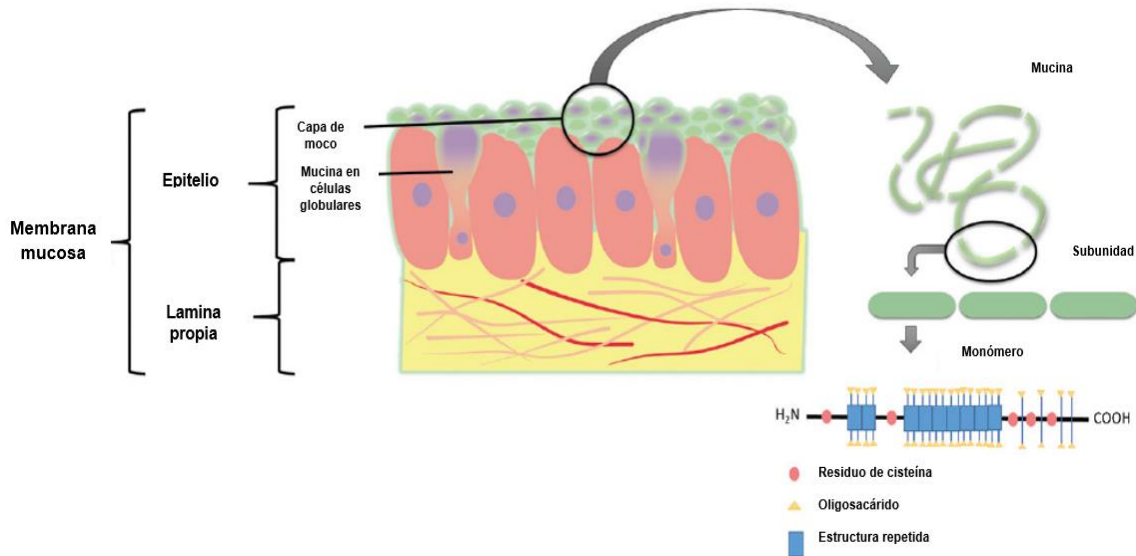
**Tipo 1.** Adhesión entre 2 fases biológicas. Por ejemplo: la agregación plaquetaria.

**Tipo 2.** Adhesión entre una fase biológica y un sustrato artificial. Por ejemplo: La adhesión celular en un medio de cultivo.

**Tipo 3.** Adhesión entre un material artificial a un sustrato biológico. Por ejemplo: La adhesión de hidrogeles sintéticos a tejidos blandos.



Cuando este fenómeno es asociado a una superficie biológica cubierta por una capa mucosa, el fenómeno se conoce como *mucoadhesión*, así con base a nuestro contexto se entenderá como *mucoadhesión* a la interacción ocurrida entre una forma farmacéutica y la membrana mucosa de la cavidad nasal. (28-30)



**Figura 15.** Membrana mucosa y estructura de la mucina. Adaptado de Bassi Da Silva, J, et al. *A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems.*

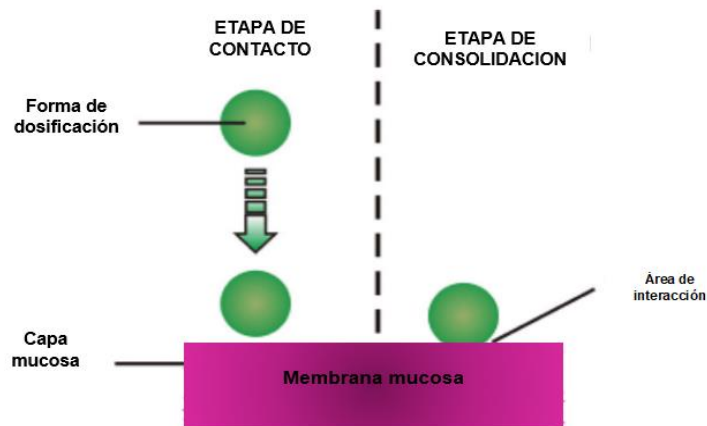
### 5.5.1. Mecanismos de mucoadhesión

El mecanismo general para este fenómeno se divide en dos pasos: la etapa *de contacto* y la *de consolidación*. (Fig.1)

La *etapa de contacto* engloba el momento en que se produce el contacto entre el mucoadhesivo (superficie o polímero) y la membrana mucosa. En este punto el material al irse hidratando se ira expandiendo e hinchando, lo que a su vez ira incrementando su movilidad su interpenetración. Se ha visto que dicha etapa se ve afectada por el estado físico del mucoadhesivo; tal es el caso de formulaciones semisólidas o líquidas, donde la humectación del material aumentara el área de contacto favoreciendo la hidratación. (32)

La *etapa de consolidación* conlleva al fortalecimiento de la unión entre el material o la superficie mucoadhesiva y la mucina. Es un proceso crítico al favorecer el libre movimiento de las cadenas que presentan actividad mucoadhesiva, lo que

permite que se establezcan interacciones químicas y electrostáticas que generan la fuerza de atracción necesaria para una adhesión prolongada.



**Figura 16.** Etapas del mecanismo de mucoadhesión. Adaptado de *Smart, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion*

Por lo anterior se tiene que la mucoadhesión se originará como resultado de una interpenetración de las moléculas del mucoadhesivo en la membrana mucosa, llevada mediante interacciones químicas y electrostáticas, entre las más comunes podemos encontrar: enlaces iónicos, enlaces covalentes, puentes de hidrogeno, fuerzas de Van Der Waals y enlaces hidrofóbicos. (29)

### 5.5.2. Teorías de mucoadhesión

Hay varias teorías que tratan de explicar este proceso y su contribución dependerá del sistema en que sea presentada, el grado de hidratación y las características mucoadhesivas del material, así como la etapa del proceso de mucoadhesión.

**Teoría de la humectación.** Es aceptada para explicar el comportamiento de sistemas bioadhesivos líquidos o de baja viscosidad y con una alta afinidad al sustrato; expresa la adhesión como un proceso de incrustación, mediante el cual los agentes adhesivos penetran en la superficie del sustrato y finalmente se endurecen, produciendo la adherencia.

Calcula el ángulo de contacto y el trabajo termodinámico realizado debido a la tensión superficial entre el adhesivo y el sustrato, y está determinado por la ecuación de Dupre:

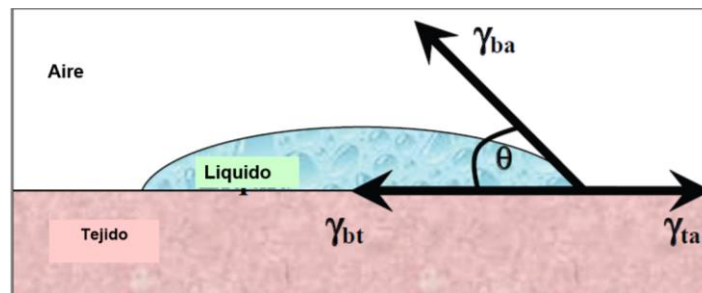
$$\omega_A = \gamma_b + \gamma_t - \gamma_{bt}$$

donde  $\omega_A$  es el trabajo termodinámico específico de adhesión y  $\gamma_b, \gamma_t, \gamma_{bt}$  representan, respectivamente, las tensiones superficiales del polímero bioadhesivo, el sustrato y la tensión interfacial.

Mediante la ecuación de Young se relacionan las tensiones en las tres fases de contacto y el ángulo formado por el líquido bioadhesivo.

$$\gamma_{ta} = \gamma_{bt} + \gamma_{ba} \cos\theta$$

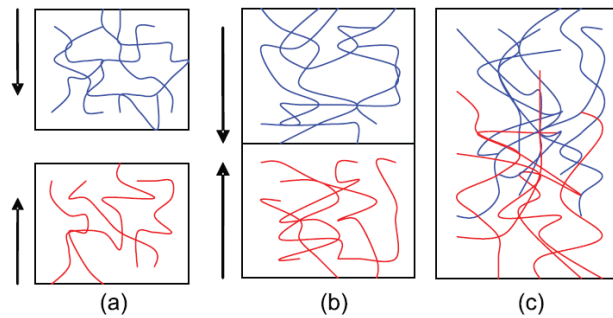
Donde  $\theta$  es el ángulo de contacto,  $\gamma_{bt}$  es la tensión superficial entre el tejido y el polímero,  $\gamma_{ba}$  la tensión superficial entre el polímero y el aire, y  $\gamma_{ta}$  es la tensión superficial entre el tejido y el aire; por lo tanto se entiende que cuando el ángulo  $\theta > 0$ , el líquido no se distribuye sobre la superficie, cuando  $\theta = 0$  el líquido humecta al sólido completamente y de manera espontánea se esparce sobre la superficie a una velocidad que depende de factores como la viscosidad del líquido y la rugosidad de la superficie sólida. (28-30)



**Figura 17.** Bioadhesivo líquido que se extiende sobre una superficie de un tejido blando. Adaptado de Shaikh. R, et al. *Mucoadhesive drug delivery systems*.

**Teoría de la difusión.** Expone cómo se produce la interpenetración entre las cadenas poliméricas del bioadhesivo a través de la interfase mucosa. Se lleva a

cabo por un proceso de gradientes de concentración los cuales impulsarán las cadenas poliméricas del bioadhesivo en la red de mucosa y las cadenas de la mucina en la matriz bioadhesiva hasta llegar a un equilibrio. Una vez que se logra el contacto íntimo, el sustrato y las cadenas del adhesivo se mueven a lo largo de sus respectivos gradientes de concentración en fases opuestas.



**Figura 18. (a)** Representación esquemática de la bioadhesión por la teoría de difusión. Capa de polímero (azul) y capa mucosa (roja) antes del contacto; **(b)** Durante el contacto; **(c)** la interfaz se vuelve difusa después del contacto por un periodo de tiempo. Adaptado de Shaikh. R, et al. *Mucoadhesive drug delivery systems*.

La profundidad exacta de interpenetración necesaria para que tenga lugar la unión adhesiva se estima en un rango de 0.2 -0.5  $\mu\text{m}$  y dependerá de características como: el coeficiente de difusión del material adhesivo, su peso molecular, carga electrostática, la capacidad de establecer enlaces químicos por puentes de hidrógeno, así como del tiempo de contacto. (28-30)

**Teoría mecánica.** Considera que la adhesión de sistemas líquidos mucoadhesivos tiene lugar cuando el líquido (sustrato) rellena las irregularidades de una superficie rugosa, aumentando el área disponible para interactuar, ya que al endurecerse se fija a múltiples sitios de anclaje y por tanto mejora las características humectantes. (30)

**Teoría de fractura.** Se utiliza para explicar el proceso de adhesión en formas sólidas, relaciona las capacidades de adhesión con la fuerza necesaria para separar las superficies adheridas después del contacto, independientemente de los factores que promovieron la unión.

La fuerza de desprendimiento para eliminar el sistema mucoadhesivo del moco se relaciona con las uniones adhesivas, además de asumir que la ruptura de estas se produce a través de la interfase. Se ha reportado que el trabajo de fractura de un polímero mucoadhesivo, es mayor cuando la malla polimérica es menos compacta o el grado de reticulación del sistema está disminuido. (30)

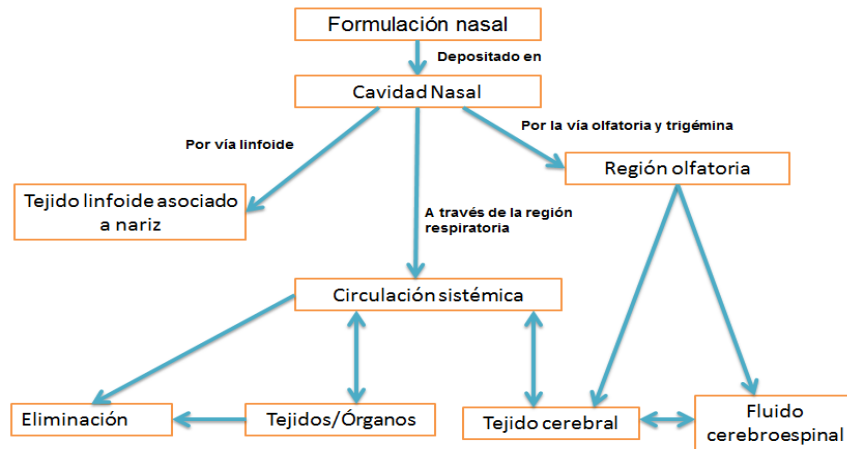
**Teoría electrónica.** Sugiere que los polímeros bioadhesivos y las glicoproteínas (mucina) tienen diferentes estructuras electrónicas; esta describe que posterior a que ambas superficies hacen contacto ocurrirá una transferencia de electrones formando una doble capa con carga eléctrica localizada en la interfase entre el sistema bioadhesivo y la membrana mucosa; en conclusión, esta teoría es el resultado de una atracción electrostática entre superficies con cargas opuestas que favorecen la adhesión. (28,30)

**Teoría de la adsorción.** Describe la adhesión por el desarrollo de fuerzas superficiales que generan uniones químicas entre un polímero adhesivo y la mucosa, en la cual, tras el contacto de interfase inicial, la sustancia mucoadhesiva se adhiere a la mucosa por interacciones primarias (enlaces covalentes y enlaces iónicos) y secundarias (puentes de hidrógeno y de Van Der Waals). Por otro parte, las interacciones hidrofóbicas pueden ser importantes, especialmente cuando el polímero es anfifílico. (28,30)

#### **5.4. Destino de la administración**

Como se ha explicado previamente la cavidad nasal por su localización anatómica y características fisiológicas es una atractiva ruta para la liberación de moléculas que pueden exhibir acciones farmacológicas en la mucosa nasal, senos paranasales, sistémica o potencialmente en el cerebro. (Fig. 19.)

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) la vía de administración nasal es definida como la ruta que se elige para administrar un medicamento a un individuo mediante las fosas nasales.



**Figura 19.** Destino de la formulación administrada en la cavidad nasal. Adaptado y modificado de Bahadur, S. et al. *Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting*

#### 5.4.1. Local

Es el tratamiento de primera elección para enfermedades como rinosinusitis, y congestión nasal; entre los fármacos más utilizados para su tratamiento se encuentran antihistamínicos, corticoides y descongestivos ya que permite un rápido alivio de los síntomas con un perfil de eventos adversos más favorable que la que ofrece la ruta oral o parenteral, ofrecen un efecto humectante además de la posibilidad de alcanzar una amplia distribución dentro de la cavidad nasal. (32)

#### 5.4.2. Sistémico

Actualmente es usada como alternativa al uso de las vías oral e intravascular, ya que a diferencia de estas la mucosa nasal, ofrece un área de superficie extensa y una alta vascularización en la cavidad nasal; además es una ruta no invasiva para el paciente, no hay metabolismo de primer paso y permite una rápida y prolongada absorción. Algunos fármacos como el propanolol, morfina, estradiol, progesterona e insulina y la vacuna *Flumist™* para el tratamiento de la influenza estacional han sido administrados por esta vía. (32)

#### 5.4.3. Sistema Nervioso

El cerebro es un órgano que lleva a cabo varias funciones vitales; actualmente la administración de medicamentos por la vía oral es la más común, sin embargo,

para el tratamiento de enfermedades o desórdenes neurológicos está vía suele ser deficiente para la liberación eficiente hacia el Sistema Nervioso Central (SNC).

En el cerebro existe una interface entre el SNC y la periferia del mismo, la cual recibe el nombre de Barrera Hematoencefálica (BHE); esta sirve de mecanismo de defensa al encargarse de proteger al SNC de patógenos, neurotoxinas y otras sustancias potencialmente dañinas, además de la presencia de transportadores de proteínas de eflujo, que reducen la exposición al cerebro, tal es el caso de la Glicoproteína-P la cual disminuye la cantidad de fármaco expuesta en el SNC, expulsándolo de nuevo hacia el torrente sanguíneo.

Los fármacos o moléculas pueden ser transportados de la mucosa nasal hacia el SNC mediante transporte del tipo paracelular, transcelular y/o transporte neuronal, esto debido a que en la cavidad nasal se encuentran localizadas fibras nerviosas olfatorias y trigeminales; sin embargo, sólo moléculas con un peso molecular menor a 500 Da y con una alta lipofilicidad son capaces de cruzar la BHE. (32)

### **5.5. Formas farmacéuticas**

La FEUM define como *forma farmacéutica* a la disposición física que se da a los fármacos y aditivos para constituir un medicamento y facilitar su dosificación y administración.

Es importante recordar que la selección de la forma farmacéutica dependerá del fármaco o molécula a utilizar, así como de la indicación terapéutica y el tipo de pacientes a quien va dirigido. (33)

**Líquidas.** Son principalmente soluciones acuosas destinadas a ser instiladas o pulverizadas dentro de la cavidad nasal; dentro de esta categoría se encuentran las gotas y sprays que se utilizan para el tratamiento de enfermedades locales como a nivel sistémico. Entre sus desventajas de uso se encuentran su baja estabilidad microbiológica, producir irritación nasal, la falta de precisión en la dosis y el goteo postnasal después de la aplicación. (33)

**Semisólidas.** En esta categoría se incluyen geles, ungüentos y sistemas líquidos que contienen polímeros sensibles a temperatura o pH; presentan como ventajas

proveer un mayor tiempo de contacto en la mucosa nasal debido a su consistencia semisólida, disminuir la frecuencia de dosificación, una reducción del goteo postnasal, además de ser más cómodos para el paciente por su facilidad para su aplicación; finalmente se pueden utilizar para la liberación de fármacos tanto a nivel local como sistémico. (33)

**Sólidas.** Se pueden desarrollar formas de dosificación en polvo si no se pueden desarrollar formas de dosificación en solución y suspensión, principalmente por la baja estabilidad del principio activo. Son una mezcla seca de principio activo y excipientes en estado pulverulento; entre las ventajas que presentan se encuentran: manejo de dosis altas, previenen la contaminación microbiana, mejoran la estabilidad del fármaco al permanecer más tiempo en la mucosa nasal; sin embargo, para que la formulación se deposite y se absorba dependerá de factores como el tamaño de partícula, irritación de la mucosa nasal, propiedades aerodinámicas, así como de la solubilidad del fármaco y excipientes. (20-23)

Presentan como desventaja la irritación de la mucosa debido a que provocan resequeidad en la misma.

**Nuevos sistemas.** Las formas farmacéuticas convencionales presentan varios problemas como la falta de precisión en la dosis, alto tamaño de partícula, alta viscosidad, así como la falta de estabilidad del fármaco, por lo que, para mejorar la conveniencia, adherencia y comodidad del paciente han surgido nuevas propuestas de formulaciones, algunas de ellas se presentan a continuación:

- o **Soluciones mucoadhesivas.** Utilizan polímeros mucoadhesivos, ejemplos de ellos son el quitosano, derivados de celulosa, policarbofil, poloxámeros, entre otros. Se ha reportado una mejora en la permeación del fármaco, además de proveer un mayor tiempo de residencia mejorando la absorción del mismo. Como desventaja puede presentarse goteo-postnasal. (33)
- o **Microesferas.** Proporcionan un contacto prolongado con la mucosa nasal, mejorando la velocidad y el grado de absorción del fármaco. Se suelen



preparar utilizando materiales biocompatibles como almidón, albúmina, dextrano, ácido hialurónico, quitosano y gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa, carbopol y combinaciones de ellos; estos al absorber las secreciones nasales forman una especie de capa de gel que se elimina lentamente de la cavidad nasal, protegiendo al fármaco del metabolismo enzimático y manteniendo así una liberación sostenida. (33,34)

- **Microemulsiones/ Nanoemulsiones.** Son sistemas bifásicos, ópticamente isotrópicos y termodinámicamente estables, compuestos de aceite, agua y tensioactivo, su tamaño de gota oscila entre los 0.01 y 0.05  $\mu\text{m}$ , por el lado contrario las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, cuyo tamaño de gota es menor a 100 nm; ambas ofrecen como ventajas una alta solubilización de fármacos lipofílicos, estabilidad termodinámica, son fáciles de preparar y manejar, proporcionan una gran área de contacto aumentando el tiempo de residencia en la cavidad nasal lo que lleva a una completa absorción del fármaco. (33,35)
- **Liposomas.** Son vesículas esféricas compuestas por una doble capa lipídica de fosfolípidos que encapsulan uno o más compartimentos acuosos (polar) donde se pueden incluir el fármaco y otras sustancias. Las ventajas que presentan son una efectiva encapsulación de moléculas de gran y pequeño tamaño, con diferentes valores de hidrofilia carácter hidrofílico o lipofílico y valores de pKa. (33-35)
- **Nanopartículas.** Son partículas coloidales sólidas con diámetros que van desde 1 a 1000 nm. Consisten en materiales macromoleculares y pueden usarse terapéuticamente como adyuvante en vacunas o como acarreadores de fármacos, en el que el principio activo es disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o adherido químicamente. (33-35)
- **Micelas.** Las micelas poliméricas son estructuras que se forman espontáneamente mediante autoensamblado de moléculas poliméricas anfifílicas (generalmente copolímeros bloque), una vez que se supera la concentración micelar crítica (CMC), y pueden alcanzar tamaños de hasta varios cientos de nanómetros. La encapsulación del principio activo dentro

de la micela previene su interacción con el medio externo, aumentando su estabilidad fisicoquímica. (33)

- **Insertos.** Son sistemas bioadhesivos que sirven para la administración prolongada de fármacos sistémicos mediante la vía nasal; su principio se basa en la imbibición del fluido nasal proveniente de la mucosa después de la administración para formar un gel, el cual se adhiere a la mucosa debido a sus propiedades bioadhesivas actuando como una matriz que controla la liberación del fármaco. (33)

## 5.6. Técnicas y dispositivos de administración

Existen dos principales formas de administrar formulaciones en la cavidad nasal:

**Liberación mediante jeringa o cuentagotas.** Implica aplicar mediante gotas utilizando una jeringa o cuentagotas que actúa como el dispositivo de dosificación. Aunque algunos autores encuentran que es un método efectivo de administración nasal presenta limitaciones como lo son el goteo postnasal y fuga anterior que dan como resultado una dosificación no uniforme de la medicación.

**Liberación mediante atomización o pulverización.** Llevada a cabo en forma de aerosol o atomizado es la técnica más reciente adoptada por la industria farmacéutica debido a la facilidad de uso y la biodisponibilidad mejorada. Consiste en administrar a través de una jeringa o una bomba que lo dispersa en finas partículas en la nariz, logrando una distribución más amplia del principio activo en toda la mucosa nasal que resulta en un aumento de la biodisponibilidad del mismo; además dado a que la formulación del fármaco se pulveriza o atomiza como una neblina, el goteo postnasal y fuga anterior son mínimos. (33)

El **dispositivo de entrega** es un componente crucial para las vacunas nasales, este deberá cumplir con las siguientes características: ser seguro y eficiente al liberar pequeñas cantidades de la formulación, debe limitar la deposición en el pulmón o el estómago, además de proporcionar un entorno compatible para la formulación y finalmente que asegure la estabilidad del producto.

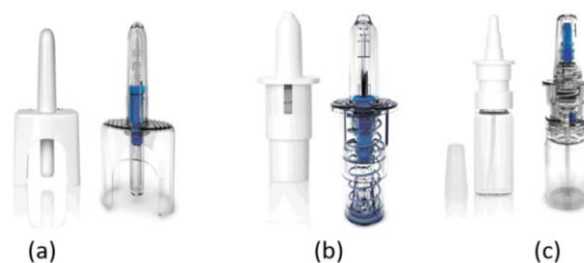
La elección entre un dispositivo y otro básicamente va a depender de su precisión en la entrega, la reproducibilidad de la dosis, el costo y la facilidad de uso. Entre los más utilizados se encuentran:

**Botellas de apretar.** Principalmente usadas para la administración de medicamentos de libre venta, tales como descongestionantes, actúan pulverizando un chorro de líquido atomizado hacia el interior de la cavidad nasal mediante la presión de la botella de plástico. La dosis y el tamaño de partícula varían en relación a la fuerza aplicada por el usuario, y cuando la presión es liberada la secreción nasal y los microorganismos pueden ser succionados en la botella, por lo que son susceptibles a contaminación. (36)

**Dispositivos de dosis medida.** Actualmente en el mercado la mayoría de las soluciones, emulsiones, suspensiones o polvos se administran mediante estos, debido a que proporcionan mayor precisión y reproducibilidad en la dosis.

Su funcionamiento consiste en instilar una capa fina de la formulación en la fosa nasal; están compuestos por el contenedor, la bomba con válvula, el tubo que se encuentra inmerso en la preparación y el pistón “actuador” que libera la dosis de medicamento en forma exacta y reproducible.

Normalmente suministran 100  $\mu$ l por pulverización ofreciendo una alta reproducibilidad de la dosis emitida, sin embargo, la precisión de la dosis dependerá de la tensión superficial y de la viscosidad de la formulación.



**Figura 20.** Dispositivos de dosis medida. (a) Unidosis (b) Bidosis (c) Multidosis. Adaptado de P. Kolhe et al., (6 ed), (2013). *Sterile Product Development*, Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. AMERICAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENTISTS. 99-144.

El volumen de llenado de estos dispositivos se encuentra desde 125  $\mu\text{L}$  (para unidosis) hasta 30 mL (para dosis múltiple), en el caso de sprays el rango se encuentra entre 25 y 140  $\mu\text{L}$ , esto es importante considerarlo ya que la elección del tipo de dispositivo dependerá de la frecuencia prevista de la dosis de la vacuna. (36,37)

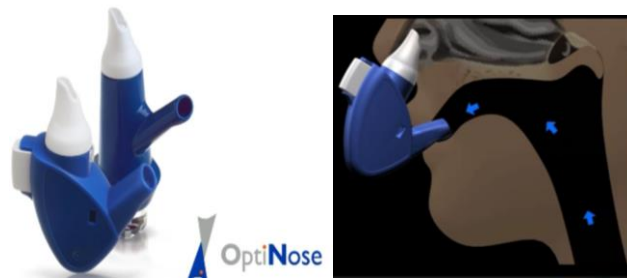
**BD Accuspray.** Fabricado por *BD Technologies*, es un dispositivo sin aguja de una sola unidad. Crea un rocío forzando la formulación líquida a través de un atomizador cuando el usuario presiona el émbolo del dispositivo. Actualmente se usa en la vacuna contra la influenza Flumist™. (38)



**Figura 21.** Dispositivo BD Accuspray (BD Accuspray™ nasal spray system) Recuperado de <https://drugdeliverysystems.bd.com/products/prefillable-syringe-systems/vaccine-syringes/accuspray-nasal-spray-system>

**OptiNose.** Su funcionamiento se basa en un sistema bidireccional de dosis única que incluye una boquilla y un inyector nasal. Fue desarrollado con el objetivo de suministrar medicamento en polvo en zonas de la cavidad nasal donde los sprays no alcanzan a llegar.

Se acciona por la respiración donde el paciente exhala aire por su boca hacia la boquilla del dispositivo así el flujo de aire entra al dispositivo y empuja el medicamento dentro de la región posterior nasal hasta el área donde se localizan los senos nasales, dando como resultado una mejor deposición de la formulación. Se ha utilizado en vacunas contra la difteria e influenza. (36,39)



**Figura 22.** Dispositivo OptiNose (Bi-Directional™ Exhalation Delivery Systems). Recuperado de <https://www.optinose.com/exhalation-delivery-systems/technical-overview>

**ViaNase ID.** Fabricado por *Kurve Technology, Inc.*, es un atomizador electrónico (batería) de dosis única sin aguja; utiliza el principio de flujo vertical para entregar formulaciones, ya que optimiza el tamaño y trayectoria de las gotas de esta forma satura la cavidad nasal y alarga el tiempo de residencia de la formulación. (31)



**Figura 23.** Dispositivo ViaNase™. Recuperado de [http://www.kurvevtech.com/devices\\_vianaseid.asp](http://www.kurvevtech.com/devices_vianaseid.asp)

## Capítulo 6. Adyuvantes

### 6.1. Generalidades

Como se ha abordado previamente la meta principal de las vacunas es el establecimiento de una resistencia “defensa” de larga duración contra enfermedades infecciosas no controladas o reemergentes, luego de una o varias inmunizaciones; por ello se han estudiado y desarrollado adyuvantes que permitan inducir una respuesta protectora efectiva de manera segura.

Los adyuvantes, también conocidos como potenciadores inmunes o inmunomoduladores, son sustancias de estructura química variada que se utilizan para estimular la respuesta inmune contra un antígeno administrado simultáneamente. El término adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa ayudar, auxiliar o asistir.

Su incorporación en la formulación de vacunas ha sido con el propósito de obtener una actividad como inmunoestimulantes y/o inmunomoduladores al o los antígenos de la misma y, por lo tanto, son de gran interés para aplicaciones desafiantes en inmunología.

Este concepto fue descrito por primera vez en el año 1925, por el científico francés Gastón Ramon que al adicionar almidones provenientes de la tapioca o saponinas a formulaciones con toxoide diftérico y administrarlas a caballos, estos generaban abscesos en el sitio de inyección además de producir mayores títulos de anticuerpos que aquellos a los cuáles no se les administraban.

Para 1926 Alexander Glennie formuló compuestos de aluminio adsorbidos con toxoide diftérico precipitado en alúmina, los cuales tenían la capacidad para producir una potente respuesta contra antígenos.

Una década después, en 1936 Jules Freund creó la primera emulsión agua en aceite mineral conocida como “Adyuvante completo de Freund”; la cual contenía micobacterias muertas, por lo cual brindaba la capacidad de desencadenar una respuesta potente, aunque es muy reactogénica para ser usada en humanos.

En 1956, Johnson demostró la actividad adyuvante de la endotoxina lipopolisacárida (LPS) proveniente de la bacteria gram negativa *Salmonella typhi*.

Stuart Harris en 1959, eliminó las micobacterias de la emulsión de Freund, surgiendo así el “adyuvante incompleto de Freund”.

Finalmente, en el año 1974, Lederer identificó el muramildipéptido (MDP) como el componente responsable de la actividad del adyuvante completo de Freund.

A partir de esta fecha empezaron a surgir nuevos estudios para crear el adyuvante “ideal” para lo cual básicamente se requería que cumpliera con requisitos como: aumentar la potencia de antígenos inmunológicamente débiles, aumentar la velocidad de la respuesta inmune frente al o los antígenos, modular la avidéz de los anticuerpos y la especificidad y evidentemente reducir la toxicidad sin olvidar que deben presentar un alto perfil de seguridad para ser usados en humanos.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, a la fecha, muy pocos adyuvantes han obtenido una aprobación para ser usados en vacunas humanas. (41-43)

### **Razones para utilizar adyuvantes**

La mayoría de las veces debido a la baja inmunogenicidad de las vacunas se requieren incorporar adyuvantes; algunas de ellas se enlistan a continuación:

- Incrementar o mejorar la respuesta inmune específica en las diversas poblaciones y así lograr una protección contra enfermedades.
- Disminuir la cantidad de antígeno en una vacuna necesaria para una inmunización exitosa y con ella aumentar la cobertura de personas vacunadas, como ocurre durante una pandemia.
- Disminuir la frecuencia de inmunizaciones requeridas, mejorando la aceptación del paciente, lo que a su vez mejora el requerimiento de costo-beneficio.
- Dirigir la respuesta inmune para lograr mecanismos más efectivos contra determinadas enfermedades. (41-43)

### **Clasificación**

A lo largo de la historia han existido diferentes clasificaciones para los adyuvantes; una de ellas es la propuesta por Cox y Coulter en 1992, quienes los clasificaron en dos grupos, los particulados y los no particulados.

Otra fue la clasificación propuesta por Edelman, quien los dividió en tres grupos:

- **Inmunoestimuladores activos:** Son aquellos que aumentan la respuesta inmune contra el antígeno.
- **Portadores:** son proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda a las células T.
- **Tipo vehículo:** Aquellas que sirven como matriz para el antígeno y para la inmunoestimulación.

Basados en la naturaleza de los adyuvantes también se les puede dividir en: adyuvantes tipo gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados, proteínas de fusión y polipéptidos, así como las citocinas.

Schijns propuso una que los caracteriza según el mecanismo de acción:

- Facilitadores de la señal 1 (presentación de antígenos)
- Facilitadores de la señal 2 (estimulación)
- Facilitadores de la señal 3 (polarización Th1/Th2)

Finalmente, la más reciente es la propuesta por O'Hagan y Valiente quienes los dividen en:

- Inmunopotenciadores: aquellos que actúan directamente sobre el sistema inmune para incrementar la respuesta frente a los antígenos.
- Vehículos: sirven para transportar antígenos de una manera directa y controlada. (41-43)

### **Mecanismos generales de acción**

Como se ha abordado la vacunación tiene como fin facilitar la formación de respuestas inmunitarias protectoras de larga duración, la cual se va a lograr mediante la activación de células de memoria T y B específicas, mediante diferentes mecanismos de acción. (42) (**Fig.23**)

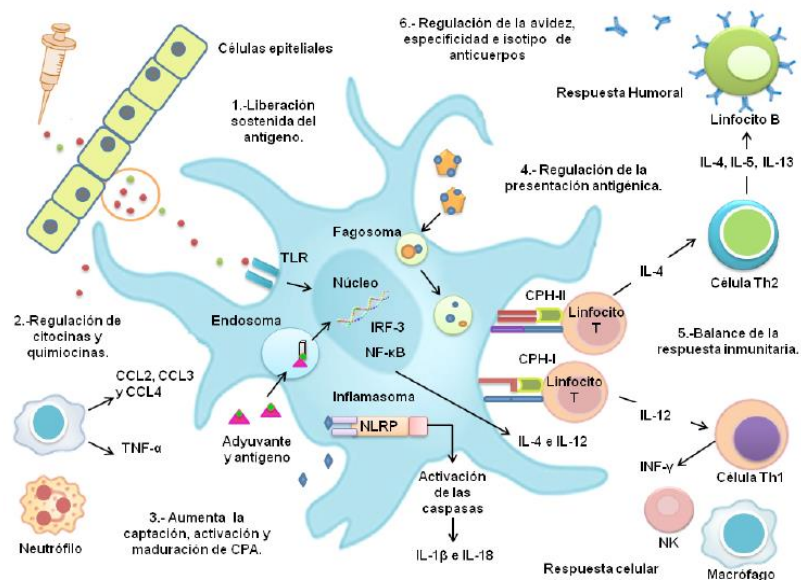
Cualquier adyuvante debe cumplir una función específica al mezclarse con un antígeno determinado, por lo que la mayoría de las investigaciones se enfocan en lo siguiente:

1. **Liberación sostenida del antígeno.** El adyuvante forma depósitos del cual se va liberando lentamente, prolongado su tiempo de vida media, lo cual



facilita el reclutamiento de CPA's, incrementando la velocidad de respuesta inmune.

2. **Regulación de citocinas y quimiocinas.** Se generará un entorno proinflamatorio localizado, y a partir de este migren células del sistema inmune innato y adaptativo hacia el sitio de inoculación.
3. **Aumento de la captación, activación y maduración de CPA's.** Involucra la participación del CPH I y CPH II.
4. **Regulación de la presentación antigénica.** Puede presentarse cuando el adyuvante une el antígeno a un determinado receptor en la superficie de la CPA's y también cuando el adyuvante introduce el antígeno a la célula. Se lleva mediante CPH I y CPH II.
5. **Modificación del balance entre perfiles de células Th CD4+.** Se modula la producción de células proinflamatoria y citocinas, que a su vez determinan si ocurre una respuesta del tipo humoral o celular.
6. **Incremento en la afinidad, especificidad, isotipo o distribución de los anticuerpos.** Aquí se promueve la inmunidad en mucosas y se estimula la respuesta inmune mediada por células. (43)



**Figura 24.** Mecanismo de acción de los adyuvantes. Adaptado de Cárdenas. A. V, et al. *Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción.*

## Requisitos para utilizar un adyuvante en vacunas

Un adyuvante ideal debe ser sometido a una evaluación de calidad en la cual se demuestre que su formulación cubre aspectos como los que se enlistan a continuación:

- Seguro, que no produzca eventos adversos inmediatos o a largo plazo.
- Bien definido desde el punto de vista químico.
- Con un mecanismo de acción bien definido.
- Biodegradable tras su administración.
- Químicamente estable en su envase y con poca probabilidad de variación entre lotes.
- Desarrollar respuesta inmune efectiva a baja concentración de antígeno, con pocas dosis y por diferentes vías de administración, incluyendo mucosas.
- De alta eficacia ante cualquier antígeno.
- Fácil de elaborar.
- Bajo costo.

### 6.2. Sales de Aluminio

A partir de que Glenny et al. en el año 1926 demostró que la combinación de alumbre de potasio y sulfato de potasio con la toxina diftérica mostraban una respuesta antigénica alta, y hasta la fecha las sales de aluminio son de las más utilizadas en vacunas para uso humano debido a su alto grado de seguridad y su bajo costo.

Los 3 compuestos de aluminio más usados como adyuvantes son: el hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) y sulfato fosfato de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})\text{PO}_4\text{SO}_4$ ).

Comúnmente se utilizan 2 métodos para preparar vacunas con adyuvantes de aluminio, el primero consiste en añadir una solución de aluminio al antígeno formando así un precipitado o gel de aluminato; mientras que el segundo método involucra la adsorción del antígeno en el gel preformado.

Al utilizar una sal de aluminio se requiere lo siguiente: el antígeno se encuentre adsorbido en partículas de aluminio cargadas y de la dosis a usar de la sal; esta última característica fue estudiada por *Gupta et al.* donde en un ensayo con ratones tras la administración de toxoide diftérico con aluminio, demostró que a dosis pequeñas de adyuvante, el antígeno se adsorbe por completo y por el contrario una cantidad excesiva puede suprimir la actividad inmune e incluso ser citotóxica para los macrófagos.

En lo que respecta a su mecanismo de acción en un inicio se creía que las sales de aluminio generaban un efecto de depósito, el cual aumentaba el tiempo de interacción con las CPA's y de los linfocitos T con el antígeno, lo que resultaba en un incremento de la fagocitosis, un aumento en la producción de células TCD4+ y la formación de anticuerpos. Sin embargo, más recientemente se ha sugerido un mecanismo que lleva a un daño celular, es decir, hay un efecto citolítico en el sitio de inyección que libera moléculas endógenas como el ácido úrico y DNA que estimulan el inflamosoma NLRP3 que a su vez libera citocinas proinflamatorias como las interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18. También se ha hablado que mediante el sistema del complemento se generaran quimiocinas como CCL2, CCL3 y CCL4 por parte de los macrófagos, o una migración de eosinófilos y monocitos. (41,42)

Dichos adyuvantes están autorizados por entidades regulatorias para su uso en vacunas de uso clínico. La FDA en el Código de Regulaciones Federales, en el título 21 (CFR 21) establece que la cantidad permitida de aluminio para usar en vacunas humanas se debe encontrar en un rango de 0.85 a  $0.125 \frac{mg}{dosis}$ . (44)

Aunque estos compuestos presentan un buen perfil de seguridad, hay reportes de que generan reacciones locales de inflamación local como lo son la formación de granulomas, eritema y nódulos subcutáneos. Por ejemplo, se ha observado que el  $AlOH_3$  atrae eosinófilos al sitio de inyección lo que incrementa los niveles de anticuerpos IgE y promueve la aparición de reacciones alérgicas; aunado a lo anterior son adyuvantes débiles y poco consistentes en su capacidad para estimular la respuesta inmune mediada por células, especialmente la de linfocitos Tc CD8<sup>+</sup>. (41,42)

Algunas vacunas con vector viral vivo o inactivo que utilizan una sal de aluminio y cuentan con licencia se muestran en la siguiente tabla

<b>Tabla 4. Vacunas que incluyen sales de aluminio</b>			
<b>Enfermedad</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Marca</b>	<b>Sal de aluminio</b>
<b>Difteria-Pertusis-Tétanos (Dtap)</b>	Intramuscular	Certiva <sup>®</sup> , Acelimune <sup>®</sup> e Infanrix <sup>®</sup>	Al(OH) <sub>3</sub>
		Tripedia <sup>®</sup>	AlPO <sub>4</sub>
<b>Virus de Hepatitis A (HAV)</b>	Intramuscular	VAQTA <sup>®</sup> y Havrix <sup>®</sup>	Al(OH) <sub>3</sub>
<b>Neumococo</b>	Intramuscular	Prevenar <sup>®</sup>	AlPO <sub>4</sub>

### **6.3. Productos bacterianos**

En la búsqueda por encontrar el adyuvante ideal que tenga el potencial de ser seguro y que genere una respuesta inmunitaria, se han estudiado componentes de microorganismos, específicamente derivados de bacterias; siendo la toxina del cólera y el monofosforil lípido A los más estudiados.

#### **6.3.1. Toxina del colera**

Dicha toxina proviene de la bacteria *Vibrio cholerae* con dos subunidades la A y la B; debido a los efectos tóxicos que generan la subunidad A solo la subunidad B es empleada para generar efectos ayudantes, la cual se encuentra en su forma purificada (CTB) o de manera recombinante (rCTB).

Se ha visto que tras la administración de rCTB en modelos animales hay un aumento en la presentación antigénica, la diferenciación de células  $\beta$ , así como la producción de citocinas y su interacción con las células T, lo que provoca ambos tipos de respuesta inmune por parte de los linfocitos Th1 y Th2.

Actualmente este ayudante no está aprobado para su uso en vacunas intranasales humanas debido a que el antígeno puede ser redireccionado hacia el sistema nervioso central en donde se ha reportado una reacción adversa grave que fue la

parálisis de Bell la cual se caracteriza por presentar debilidad muscular de un solo lado de la cara. (42,45)

### **6.3.2. Monofosforil Lípido A (MPL)**

El MPL se obtiene por hidrólisis y purificación del lipopolisacárido (LPS) obtenido de la membrana externa de la bacteria Gram negativa *Salmonella Minnesota* RC-595. Es un potente estimulador de la respuesta inmunitaria por la presencia del lípido A., además debido a su baja toxicidad representa una mejor alternativa en el desarrollo de vacunas para humanos.

Desde el punto de vista inmune se le considera un PAMP ya que puede inducir tanto una respuesta inmune celular como humoral después de una vacunación sistémica o a nivel de mucosa.

El mecanismo exacto de acción en seres humanos aún no está por completo estudiado, sin embargo, se sabe que la respuesta inmune celular inicia cuando el receptor TLR-4 reconoce al MPL, activando una cascada de señales, como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la expresión de citocinas proinflamatorias como: IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  y GM-CSF. En lo que refiere a la inmunidad humoral se caracteriza por generar los isotipos IgG e IgA.

Al utilizarlo como adyuvante nasal en combinación con nanopartículas de quitosano en ratones se observa una producción alta de títulos de anticuerpos IgG e IgA.

El MPL fue el primer adyuvante que activa TLR-4, aprobado para su uso como componente en la vacuna humana contra la Hepatitis B en Europa en el año 2005. A la fecha se sigue proponiendo como un adyuvante para utilizarse en vacunas contra VPH, HSV, Malaria y Tuberculosis; aunque también forma parte de sistemas de adyuvantes como AS01, AS02 y AS04. (42,45)

### **6.4. Patrones moleculares asociados a patógenos**

Este tipo de moléculas se consideran inmunopotenciadoras; se destacan por poder actuar sobre los receptores TLR que son capaces de reconocer lípidos,

lipoproteínas, ácidos nucleicos y proteínas, también por inducir la maduración y la activación de las células presentadoras de antígeno que en un acto seguido generan una migración de células del sistema inmune innato hacia el sitio de administración y finalmente también estimulan la secreción y la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que dan como resultado final una inducción a la respuesta inmunitaria adaptativa específica de antígeno.

Dentro de esta categoría se pueden encontrar las siguientes tres:

#### **6.4.1. Flagelina**

Es una proteína con una secuencia de aminoácidos conservada. De acuerdo con naturaleza forma parte del filamento de flagelos bacterianos que por su capacidad agonista del receptor TLR-5 ha sido propuesta como un posible adyuvante.

A pesar de que el mecanismo de acción exacto todavía no se conoce con certeza, se ha visto que cuando la flagelina se administra fusionada a un antígeno específico este aumenta la capacidad de este para inducir una respuesta inmune al formarse la interacción TLR5-flagelina, la cual conlleva a la activación del complejo proteico NF- $\kappa$ B, provocando una producción de citocinas que resultan en un aumento en la respuesta inmune tanto humoral como celular. (42)

#### **6.4.2. Oligodesoxinucleótidos (CpG-ODN)**

Se trata de secuencias no específicas de DNA bacteriano que contienen los oligodesoxinucleótidos: citosina y guanina en forma no metilada, quienes son reconocidas por células del sistema inmune innato incluyendo macrófagos y células dendríticas por medio del receptor TLR-9 presente en células epiteliales de las mucosas.

Hablando de la utilidad potencial de CpG como adyuvante en mucosas, hay evidencia de que al entrar en contacto con la mucosa nasal activa directamente la proteína transmembranal CD11c+ que se expresa en células B y células dendríticas; además de haber una producción de IL-6 e IL-8, una potente respuesta por parte de linfocitos CD4+ y CD8+, la liberación de citocinas y quimiocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12) así como la expresión de moléculas coestimuladoras y del CPH II.

La capacidad de CpG ODN, para actuar como un adyuvante nasal en la mucosa al ser coadministrado con un antígeno en vacunas ha sido examinada extensamente; tal es el caso de un estudio realizado por *Hoft et al.*, el cual confirmó que al administrar intranasalmente el adyuvante con transialidasa recombinante presente en el parásito *Trypanosoma cruzi*, se obtiene una potente respuesta inmunitaria a nivel mucosa y sistémica.

Del mismo modo, una vacuna intranasal compuesta por *Entamoeba histolytica galactosa/N-acetil-d-galactosaminaco con lecitina inhibible* (Gal Lecitin) en combinación con CpG ODN desencadenó un fuerte respuesta Th1, además de obtener anticuerpos IgG e IgA detectables en suero y heces. (45-47)

Actualmente hay una vacuna de administración muscular que cuenta con la aprobación de la FDA y utiliza un CpG como adyuvante y es HEPLISAV-B® la cual protege contra el virus que provoca la Hepatitis B.

#### **6.4.3. Lipopolisacárido (LPS)**

Es un componente natural de la pared celular de las bacterias Gram negativas, el cual se encuentra conformado por 2 compuestos: el lípido A, que a su vez se compone de 2 moléculas de N-acetilglucosamina fosforiladas que se unen a 6 o 7 cadenas saturadas de ácidos grasos, que sirven para anclar toda la estructura en la membrana externa de las bacterias gram negativas; y una cadena de polisacárido en el cual se distingue un núcleo y el antígeno O.

Cuando el LPS ingresa al organismo es transportado y concentrado en el plasma por la proteína fijadora de LPS (LBP) dando lugar a la formación del complejo LPS/LBP que se une con el CD14, una proteína de membrana que actúa como principal receptor para el LPS en la superficie de células mononucleares. Aunque CD14 carece de dominio citoplásmico al interactuar con el receptor TLR-4 hay una transducción de señales citoplasmáticas que llevan a la producción de citoquinas como el TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-15. (42,46)

## **6.5. Saponinas**

La saponina (QS-21) o derivados de *Quillaja saponaria molina* (Quil-A), son glucósidos tensoactivos aislados de la planta con un núcleo hidrofóbico de estructura triterpenoide y cadenas de carbohidratos que conforman las regiones hidrofílicas.

En 1995 se aisló un componente purificado de Quil-A, de baja toxicidad y con un gran poder adyuvante, al cual se le conoce como QS-21.

Acerca de su mecanismo de acción se sabe que se forma un complejo saponina-antígeno que a su vez se unirá al receptor DEC-205 en las células dendríticas para posteriormente, ser endocitadas y poder liberar los antígenos en el citoplasma.

Además, se ha demostrado que QS-21, potencia la presentación antigénica en moléculas de CPH I y CPH II, activa la respuesta celular de linfocitos Th1, que produce las citocinas IFN- $\gamma$  y la IL-2, de linfocitos CD8+ citotóxicos y la respuesta humoral que libera inmunoglobulinas IgG2a.

Es probable que el QS21 sea el adyuvante más efectivo contra patógenos que requieran una potente respuesta inmune que involucre los linfocitos T citotóxicos sin embargo tras su administración se han presentado reacciones reactogénicas graves como: formación de granulomas y un efecto hemolítico por lo que se encuentra restringido su uso en humanos (42,45,46).

## **6.6. Sistemas de liberación particulados**

La formulación de antígenos en sistemas de liberación particulados para la administración intranasal puede presentar las siguientes ventajas: protección del antígeno de las enzimas presentes en la mucosa, facilitar la captación preferencial del antígeno encapsulado por células NALT especializadas, mantener una liberación sostenida del antígeno al presentarlos a las CPA's, un aumento del tiempo de retención en el sitio de administración por bioadhesión, así como una inducción de la respuesta inmune mediada por células modificando la presentación de antígenos a CPA's.



Por otro lado, entre las desventajas que se presentan con este tipo de sistemas se encuentran: la desestabilización del antígeno durante el proceso de manufactura o después de la administración, el estatus regulatorio e industrial relacionado con el proceso de manufactura y de los componentes utilizados, alto costo comparado con vacunas formuladas en solución y una limitada liberación del antígeno encapsulado.

El mecanismo de transporte de los diversos sistemas particulados para la administración intranasal de vacunas aún no se conoce por completo, sin embargo, se sabe que la función principal de los sistemas de liberación particulados es la de promover el depósito del antígeno y que éste sea presentado por las CPA's, lo que despertará una respuesta inmune innata que incluye macrófagos, células dendríticas y de linfocitos T y B de memoria.

En las últimas décadas han surgido sistemas particulados estables que se pueden dividir en dos grandes categorías, aquellos que contienen lípidos en su estructura y los que se conforman de algún polímero natural o sintético. (41,42,45,46)

Los más utilizados en la administración nasal de vacunas se enlistan y discuten en la siguiente sección.

### **6.6.1. Emulsiones**

La FEUM define una emulsión como un sistema heterogéneo constituido de dos líquidos no miscibles entre sí en el que la fase dispersa está compuesta de pequeños glóbulos distribuidos en el vehículo en el cual son inmiscibles. La fase dispersa se conoce también como interna y el medio de dispersión se conoce como fase externa o continua. (31)

Existen emulsiones de 2 tipos: agua en aceite (w/o, por sus siglas en inglés), en la cual las gotas de agua o solución acuosa es la fase dispersa o interna y se va a encontrar inmersa en la fase externa o continúa compuesta por aceite; y la aceite en agua (o/w, por sus siglas en inglés) donde la fase continua es el agua o la solución acuosa y la fase dispersa es aceite. Además del agua y aceite, para estabilizar la emulsión se hace uso de un *surfactante*, un componente de naturaleza anfipática, el cual se va ubicar sobre la superficie de las gotas y así evitar o retardar la coalescencia de las mismas, manteniendo estable la emulsión.

Las emulsiones más utilizados en vacunas con función adyuvante se describirán a continuación:

#### **6.6.1.1. MF59™**

Producido por la farmacéutica NOVARTIS®, fue el primer adyuvante en emulsión autorizado para uso humano, recibiendo dicha aprobación en el año 1997.

El MF59, es una nanoemulsión aceite en agua (o/w), donde la fase discontinua se encuentra compuesta de microvesículas pequeñas, uniformes, estables, de tamaño aproximado a 160 nm de diámetro, compuesta por un 4.3% de aceite de escualeno, que se caracteriza por ser biocompatible, al ser un componente natural de las membranas celulares, un precursor en la producción de hormonas esteroideas y un intermediario en la biosíntesis del colesterol; la fase continua se encuentra conformada por un tampón de citrato de sodio; finalmente la emulsión es estabilizada por la adición de dos surfactantes no iónicos: el Polisorbato 80 (Tween 80) y el Trioleato de Sorbitan 85 (Span 80) ambos en una concentración al 0.5%.

Su proceso de manufactura consiste en la dispersión del surfactante, el Span 85, en la fase de escualeno, mientras que el Tween 80 se dispersa en la fase acuosa; después se somete a homogenización a alta velocidad para producir una emulsión (o/w) de tamaño de gota pequeño y uniforme (aprox. 160 nm), finalmente se filtra de forma estéril por un filtro de membrana de 0.22 µm.

A la fecha el mecanismo preciso de la adyuvancia del MF59™ es desconocido, pero se ha descrito que dicha emulsión tiene la capacidad de estimular el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas e interactuar con las CPA's en el sitio de inyección. Un segundo mecanismo menciona la capacidad de activación directa de las fibras musculares que producen mediadores inmunes que a su vez activan las células dendríticas; en resumen ambos resultan en un aumento en la captación y en la eficiencia de la presentación antigénica además de estimular la respuesta inmune mediada por anticuerpos; aunque también se ha reportado que

este adyuvante participa en la generación de memoria inmunológica a través de la producción de células Th1 y Th2 en modelos murinos.

Se ha utilizado en vacunas de gripe estacional y en contra de la influenza H5N1 y H5N3, y más recientemente contra la variante de influenza H1N1. Algunas de ellas son: Fludax<sup>®</sup> producida por el laboratorio Seqirus<sup>™</sup> y Fluzone<sup>®</sup> High-Dose producida por Sanofi-Pasteur<sup>™</sup> ambas vacunas tetravalentes utilizadas para la inmunización de adultos mayores. Fluarix<sup>®</sup> producida por GlaxoSmithKline<sup>™</sup> vacunas tetravalente utilizadas para la inmunización de población pediátrica.

Aunque la mayoría de las vacunas con MF59 con licencia para uso humano se administran por la vía intramuscular, el centro de Control para la Prevención de Enfermedades en Estados Unidos, autoriza el uso de una vacuna vía intranasal en pacientes entre los 2 a 49 años.

*Flumist<sup>®</sup>* de la farmacéutica AztraZeneca, es una vacuna tetravalente diseñada para proteger contra 4 virus gripales: Influenza A (H1N1 y H3N2) y dos de la Influenza B, diseñada en un spray nasal con un contenido de 0.2 mL. (41,42,48)



**Figura.25.** Vacuna Flumist<sup>™</sup>. Adaptada de: <https://www.agenciasinc.es/Visual/Fotografias/Se-acerca-la-vacuna-universal-contra-la-gripe>

Aunado a lo anterior existen diversos estudios que utilizan el MF59 en vacunas nasales, uno de ellos es Boyce *et al.*, quien realizó un estudio fase 1 con 31 adultos sanos, en el cual se evaluó la seguridad y la inmunogenicidad producida al utilizar la vacuna contra la influenza (Arippal SI<sup>™</sup>) sin adyuvante y la vacuna con el adyuvante MF59; donde se obtuvo que ambas eran fáciles de administrar, seguras y bien toleradas por los pacientes, los cuales además mostraron una

respuesta de anticuerpos IgA, lo que a su vez llevo a mostrar evidencia de la generación de inmunidad en las mucosa.

#### **6.6.1.2. AS03**

Fabricado por la empresa GlaxoSmithKline, es una combinación de una emulsión aceite en agua (O/W) que contiene 10.69 mg de aceite de escualeno, 11.86 mg de Vitamina E (DL- $\alpha$ - tocoferol) y 4.86 mg de Polisorbato 80.

El AS03 fue evaluado por primera vez en una vacuna candidata para tratar la malaria.

El mecanismo de acción radica en la estimulación de los macrófagos. Su activación genera citocinas como la IL-6, responsable de la maduración de los linfocitos T y B; además, este sistema favorece la llegada de células dendríticas al lugar de la inyección, lo que intensifica aún más la toma de antígeno. Se incluye en la vacuna frente al virus de la influenza (subtipo H5N1), cuyo nombre comercial es Prepandrix® y su uso se reserva en casos de pandemia. (49)

#### **6.6.1.3. SEPIVAC SWE™**

Con excepción de las sales de aluminio, los adyuvantes han sido desarrollados principalmente por grandes empresas farmacéuticas y por tanto se rigen bajo una patente lo cual los vuelve de difícil adquisición para investigadores, pequeñas empresas de biotecnología y para los fabricantes de vacunas sobre todo de países en desarrollo.

Es por ello que para facilitar el acceso a este tipo de adyuvantes, el Instituto de Formulación de Vacunas fundado en Enero de 2010 en Suiza bajo la supervisión OMS, se encargó de apoyar el desarrollo de adyuvantes y vacunas eficaces para los países en desarrollo ante el posible comienzo de una pandemia; siendo para el mes de Octubre del mismo año, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos transfirió la tecnología para la producción y caracterización de una emulsión de aceite en agua como adyuvante de vacunas contra la influenza pandémica en Indonesia, dicho adyuvante libre de patente hoy en día recibe el nombre de *Sepivac SWE™* fabricado por Seppic. (50)

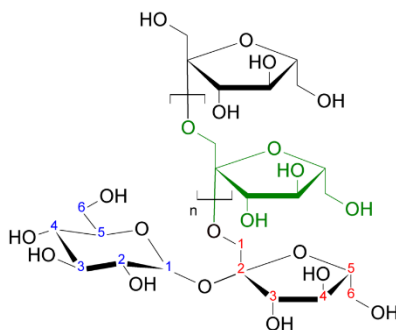
*Sepivac SWE™* es un adyuvante compuesto por aceite de escualeno al 3.9 %  $\frac{m}{v}$ , trioleato de sorbitán (Span 85) y monooleato de sorbitán polioxietileno (Tween 80) ambos en una concentración del 0.47 %  $\frac{m}{v}$ , dispersos en tampón de citrato 10 mM a pH 6.5.

Su fabricación consiste en agregar la fase acuosa que contiene el Tween 80 en el tampón de citrato a la fase oleosa conteniendo el aceite de escualeno y Span 85, y homogenizarla en un mezclador de cizalla a 8000 rpm durante 2 minutos e inmediatamente micro fluidizado a 20,000 psi mientras se enfría a 10 °C. La emulsión final se esteriliza por filtración.

Ha demostrado ser seguro y eficaz, permitiendo la adyuvancia como la reducción de dosis en numerosas vacunas en estudios preclínicos; algunas en las que se ha estudiado son contra el virus de la influenza (H7N9 y H5N1) el de poliomielitis inactivado, rabia, estreptococo del grupo A y recientemente contra el virus SARS-COV2. En cuanto a la respuesta inmune generada se ha visto que activa la respuesta humoral y con ello la proliferación de linfocitos Th1 y Th2, así como la respuesta celular al generar la producción de anticuerpos IgG. (51,52)

#### **6.6.1.4. Advax™**

La inulina es un polisacárido de fructano simple de origen vegetal que comprende una familia de cadenas poliméricas lineales de ( $\beta$ -D- [2→1] poli (fructofuranosil)  $\alpha$ -D-glucosa) en las que una cadena no ramificada de fructosa termina con una sola glucosa. Es utilizada como carbohidrato de reserva energética presente en plantas de la familia *Compositae* como lo son la dalia, cebolla y ajo. (Fig.26)



**Figura 26.** Fórmula estructural de la inulina. Adaptado de Petrovsky, N. et al. Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety.

Existen diversas isoformas de inulina, la alfa ( $\alpha$ ) y la beta ( $\beta$ ) que se obtienen por precipitación en agua y etanol respectivamente; ambas son altamente solubles en agua a 25 °C; por otra parte, existen también las isoformas: gamma ( $\gamma$ ) soluble en agua a una temperatura de 37 °C y la delta (D) que es insoluble a temperaturas inferiores a 40°C.

Si bien sus isoformas solubles no tienen actividad inmunológica, se ha estudiado que la D-inulina al ser insoluble a la temperatura corporal puede formar una estructura cristalina que, al ser incorporada en sistemas de liberación como las micropartículas, se obtiene un potente adyuvante.

**Advax™** es un adyuvante compuesto de micropartículas de poliructofuranosil-D-glucosa (D-inulina), el cual a diferencia de otros adyuvantes particulados no requiere de la adsorción con un antígeno para mediar su efecto, ya que se ha visto que proporciona un efecto adyuvante incluso al administrarse 24 horas antes de la administración del antígeno.

Se ha utilizado para mejorar la eficacia de vacuna contra la influenza, la hepatitis B, el virus del Nilo Occidental, la encefalitis japonesa, VIH, SARS y ántrax, los cuales han demostrado una inmunogenicidad superior, además de ser efectivo y seguro tanto en ensayos clínicos realizados en animales de experimentación como en humanos; tal es el estudio realizado por *Saade et al. 2013*, en el que al incorporar dicho adyuvante en una vacuna contra la hepatitis B en ratones obtuvo una respuesta proliferativa de linfocitos Tc CD8+ , así como una producción de

INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y GM-CSF; mientras que en el caso de las vacunas contra la influenza se ha observado una alta producción de anticuerpos IgG e IgM, así como en la respuesta proliferativa de linfocitos Th2, Th1, CD4+ y CD8+, INF- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-6 y GM-CSF.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados, su mecanismo de acción aún no está completamente estudiado. Recientemente en el año 2016 *Hayashi, M et al*, en su estudio con ratones knockout, concluyó que el uso del adyuvante Advax™ en combinación con diferentes antígenos, básicamente se encarga de activar la expresión génica de las vía de señalización del sistema inmune como IL-1 $\beta$ , receptores de lectina tipo C (LCR) y TNF- $\alpha$ , además de tener la capacidad de inducir la activación de células dendríticas *in vivo*, sin inducir una muerte celular local ni la liberación de DNA; otra característica muy importante que se observo es respecto al efecto adyuvante el cual no se ve afectado por la vía de administración utilizada, ya la eficacia observada fue la misma tras una administración intramuscular, intradérmica o intraperitoneal, debido a lo anterior se sugirió que a diferencia de los adyuvantes típicos de PAMP que activan directamente las células dendríticas, *Advax* por su parte activa indirectamente a los macrófagos fagocíticos con los que interactúa en el lugar de la inyección, lo que resulta en una secreción de señales solubles que se transducen a los tejidos linfoides remotos.

Si bien este adyuvante ha mostrado una interesante actividad adyuvante aún queda estudiar aún más el mecanismo de acción, así como su papel como potencial adyuvante de la mucosa y explorar su potencial adyuvante con otros activadores inmunitarios. (53,54)

### **6.6.2. Nanopartículas**

Las nanopartículas son sistemas de soporte que pueden estar conformados de polímeros sintéticos como naturales; proporcionan una forma adecuada para la administración nasal de moléculas antigénicas, lo cual principalmente se debe a tres características:

- Son las únicos capaces de incrementar eficazmente la cantidad de antígeno que llega al sistema inmunitario.
- Su uso puede controlar la liberación del antígeno por periodos prolongados de tiempo
- Pueden combinar la función de la liberación del antígeno con la inmunoestimulación.

Los podemos dividir en dos grupos las que se conforman por lípidos (liposomas, virosomas, ISCOM's, proteosomas y SMBV<sup>TM</sup>) y las poliméricas de origen natural o sintético (quitosano, PLA/PLGA, alginato y dextrano).

### **6.6.3. Liposomas**

Son vesículas con una o más capas formadas por colesterol y fosfolípidos, que rodean a un núcleo acuoso. Su incorporación en vacunas ha demostrado ser inmunológicamente efectiva al haber un incremento en la presentación del antígeno por parte de las CPA's, además de ocurrir un proceso de endocitosis mediado por macrófagos.

Su tamaño varía entre los 20 a 50  $\mu\text{m}$  y debido a su naturaleza anfipática tienen la capacidad de encapsular en su núcleo acuoso o anclar en la bicapa lipídica antígenos como proteínas, citocinas, péptidos e incluso plásmidos de DNA y adyuvantes.

Con el fin de potenciar el efecto adyuvante de los liposomas se pueden incorporar inmunopotenciadores como receptores tipo Toll, LPS y derivados de CpG.

Propiamente en lo que refiere a su utilidad como adyuvantes en vacunas de administración nasal, se ha visto que tras la administración de la toxina tetánica contenida en una formulación liposomal en solución se obtienen grandes cantidades de anticuerpos IgG e IgA; lo mismo se observó en un estudio que utilizó albúmina de suero bovino.

En lo que respecta a la administración nasal de liposomas basados en proteínas o en DNA, se ha reportado una inducción tanto de una respuesta del tipo humoral



como celular, destacándose la producción de linfocitos Th1 como los CD4+ y Th2. (41,42,55)

#### **6.6.4. Virosomas**

Son estructuras similares a los liposomas; básicamente son vesículas esféricas de un tamaño aproximado de 150 nm que contienen glicoproteínas de la envoltura viral del virus de influenza (hemaglutinina y/o neuraminidasa) las cuáles se van a encontrar incrustadas en su membrana de fosfolípidos.

Estos pueden ser de dos tipos:

- Partículas pseudovirales (VPL)
- Virosomas de Influenza Reconstituidos Inmunopotenciadores (IRIV)

Su manufactura consta de la extracción de glicoproteínas de partículas virales, seguida de la solubilización de las mismas y de los fosfolípidos para posteriormente eliminar el tensoactivo solubilizante.

En lo que respecta a su mecanismo de acción, se sabe que ocurre por la interacción del virosoma con receptores, que intervienen en la endocitosis de las CPA's, en otras palabras, las glicoproteínas presentes en la membrana del virosoma se fusionan con células del sistema inmune, por ejemplo, macrófagos, para que una vez dentro de la célula, liberen los antígenos en la diana específica, ya que se imita la forma natural de una infección viral, permitiendo que haya una respuesta inmune humoral como celular. Para ello los antígenos adsorbidos en la superficie del virosoma, se internalizan y son procesados por la vía endocítica donde son presentados al CPH II, para estimular a los linfocitos T CD4+, mientras que los antígenos que se localizan dentro del virosoma son llevados directamente al citosol y son presentados a moléculas del CPH I, para estimular los linfocitos Tc CD8+. Finalmente, cuando este proceso culmina, el virosoma se degrada en el interior de la célula.

La administración de vacunas mediante la vía intranasal presenta una ventaja al proporcionar un mecanismo de unión eficiente de los antígenos a la superficie de la mucosa respiratoria, debido a que las glicoproteínas de superficie viral poseen una alta afinidad por sus receptores; el cual se observó en un estudio hecho por Pederson et al., evaluó la efectividad de una vacuna contra la influenza H5N1

cargada en virosomas, mediante las vías de administración sublingual, intranasal e intramuscular en ratones; llegando a la conclusión de que tanto la vía sublingual como la intranasal inducían una mejor respuesta inmune local en la mucosa así como a nivel sistémico a comparación de la intramuscular, sin embargo, la respuesta a nivel mucosa obtenida fue más fuerte en la administración intranasal. Actualmente los virosomas se incluyen como sistema de transporte en la vacuna Epaxal™, contra el virus de la hepatitis A y en la Inflexal™ contra la gripe, para uso intramuscular. En el caso de la vía nasal existe una patente activa (MX/a/2008/001563) de una vacuna intranasal antigripal basada en virosomas bajo la licencia de *Solvay Biologicals B.V.* (16, 41,42,45)

#### **6.6.5. ISCOMs**

El termino ISCOM fue descrito por primera vez en 1984 como resultado de la búsqueda de un sistema de liberación de antígeno inocuo y con una capacidad inmunomoduladora satisfactoria.

Los complejos inmunoestimulantes o conocidos como ISCOMs, son nanopartículas esféricas con una estructura tipo jaula (simetría icosaédrica) compuestas por 12 subunidades morfológicas de 10 a 12 nm de saponina Quil A y colesterol, fosfolípidos y antígenos anfipáticos semejantes a las proteínas de membrana. Tienen un tamaño aproximado de 40 nm.

Se obtienen mediante la solubilización del antígeno proteico viral, el colesterol y los fosfolípidos con un detergente (generalmente Tritón X-100) que posteriormente se intercambia con Quil A. Los ISCOM contienen principalmente Quil A en una concentración del 60 al 70 % que pueden provocar hemólisis con la administración parenteral.

Cuando un ISCOM no contiene antígeno se conoce como adyuvante ISCOMATRIX.

Al tener un tamaño similar al de los virus y generar una fuerte actividad inmunoestimuladora por el contenido de saponinas, se vuelven un sistema de transporte interesante para usar en vacunas.

Diversos estudios indican que estas nanopartículas tienen la capacidad de generar una fuerte respuesta inmune específica tanto sistémica como local al mejorar la captación de los antígenos y dirigirlos hacia las CPA's al activar el CPH II, generar anticuerpos y activar la respuesta de linfocitos T como son: Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4) y Tc, al ser administrados por vía parenteral e intranasal.

*Lovgren et al*, fue el que tuvo el primer acercamiento hacia el desarrollo de una vacuna conteniendo ISCOMs, con el fin de inducir una respuesta inmune en la mucosa nasal usando como antígeno proteínas de la envoltura del virus de influenza, sin embargo, *Jones et al*. fue quién llegó a la conclusión que tras esta administración intranasal se indujo una respuesta específica en la mucosa respiratoria local, principalmente de anticuerpos IgA.

Aunque también se ha visto que existe una respuesta de anticuerpos IgG, en estudios con ratones al administrar junto con el antígeno *Mycoplasma mycoides* (MmmSC). (16,42,45,56)

#### **6.6.6. Proteosomas**

Son nanopartículas que comprenden proteínas de membrana externa altamente hidrofóbicas con trazas de lipooligosacáridos purificados, particularmente proveniente de *Neisseria meningitidis*. Los principales componentes proteicos de los proteosomas derivados de *N. meningitidis* son: PorA (clase 1) y PorB (clase 2) y la proteína de clase 4.

Su tamaño es generalmente comparable al tamaño de ciertos virus, variando de 20 hasta 800 nm, el cual dependerá del antígeno utilizado.

Varios estudios sugieren que los proteosomas solos o formulados con lipopolisacáridos pueden formar el complejo "proteosoma-antígeno" que producirá una respuesta inmunitaria sistémica y local en la mucosa después de la administración intranasal; lo cual se traduce en un aumento en la expresión del CPH I y CPH II, que a su vez lleva a la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Asimismo, se ha concluido que debido a la hidrofobicidad que presentan los proteosomas se puede prevenir la degradación de los antígenos en las secreciones nasales, lo que facilita dirigirlos hacia vías intracelulares induciendo una fuerte respuesta inmune Th1.

Algunas vacunas contra influenza y *Shigella flexneri* administradas vía intranasal han sido eficaces y bien toleradas en estudios clínicos realizados en adultos sanos. (16,57)

#### **6.6.7. SMBV**

SMBV™ es un sistema nanoparticulado que consiste en un núcleo de un polisacárido cargado positiva o negativamente, rodeado de una membrana lipídica formada por los fosfolípidos: dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol. Su diámetro se encuentra entre los 50 y 100 nm, siendo el de 60 nm adecuado para su aplicación en vacunas. Este sistema, imita el tamaño y la estructura de las nanopartículas de los virus y se utiliza como portador de proteínas y/o péptidos en vacunas, especialmente a través de aerosoles nasales.

Algunas ventajas de este sistema para la administración eficaz de antígenos se enlistan a continuación:

- Capacidad para entregar una amplia gama de proteínas y péptidos de naturaleza hidrofílica o lipofílica.
- Se aumenta el tiempo de vida media, debido a que se protegen a las moléculas biológicas de una degradación.
- Hay una adhesión sostenida en las membranas mucosa y serosas, por ejemplo: en la superficie nasal.
- Genera una respuesta inmune humoral (linfocitos B) y celular (linfocitos Th1, Th2, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>).
- Se pueden combinar diferentes antígenos con adyuvantes.

Estudios han mostrado que el sistema SMBV aumenta el tiempo de residencia en la mucosa nasal humana, lo que permite la unión directa del antígeno a la mucosa nasal, esto es posible debido a que la carga positiva del núcleo interactúa con la carga negativa de la superficie mucosa generando una interacción del tipo iónico. Este comportamiento se ha visto al utilizar materiales como poli- L-arginina y quitosán.

Una de las primeras vacunas que incorporaron este sistema fue con el virus de la influenza A administrado en ratones. El sistema SMBV™/Flu, demostró una buena inducción de la respuesta inmune local, así como una respuesta inmune sistémica comparable a la obtenida con la administración subcutánea; también se observó que tras cinco meses después de la administración aún se cuantificaban títulos de anticuerpos IgG e IgA. Tiempo después debido a la buena respuesta en animales, se prosiguió a realizar un ensayo clínico en humanos con tres diferentes concentraciones de antígeno (7.5, 15 y 30 µg); así se obtuvo que ninguna dosis mostro signos de toxicidad o intolerancia al antígeno, además de observarse una mayor respuesta inmune a dosis más altas y evidentemente la producción de anticuerpos IgA e IgG. (16,58)

#### **6.6.8. PLA, PLGA y PEG**

Las nanopartículas producidas a partir de poliésteres como poli (DL-láctico) conocida como PLA y las de poli (ácido- DL-láctico-coglicólico) conocidas como PLGA, han sido ampliamente evaluadas en su aplicación en vacunas, debido a su efectividad para la entrega de antígenos en el sistema inmune; debido a que promueven la interacción con las superficies mucosas y con ello la permeabilidad o la penetración a través del epitelio, además de mejorar el reconocimiento del antígeno por el sistema inmune de las mucosas, así como promover la liberación de este en su forma bioactiva.

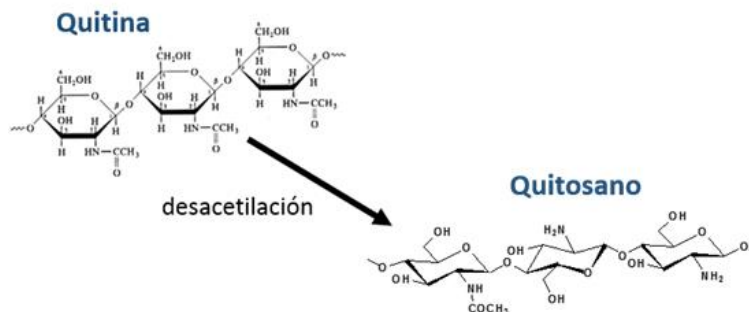
Estos materiales han sido investigados desde principios de los años 90 y a la fecha se ha demostrado que no presentan riesgo de toxicidad, ya que son biodegradables y biocompatibles, protegen y controlan la liberación del antígeno; sin embargo, presentan cierta inestabilidad al encapsular el antígeno con la matriz polimérica y al entrar en contacto con los fluidos de la mucosa, así como una baja capacidad de transporte al atravesar las superficies mucosas.

Con el fin de mejorar las propiedades de superficie de PLA y PLGA, se ha propuesto la adición de polietilenglicol (PEG), en donde el sistema se forma por un núcleo hidrofóbico de PLA, conteniendo el antígeno reservorio y un recubrimiento de PEG que es de naturaleza hidrofílica.

En lo que respecta a su uso en vacunas nasales, *Mansoor et al.* reportó que partículas de PLGA que contenían encapsulado el virus bovino de influenza tipo-3, aumentaban la respuesta humoral en ratones tras la administración nasal, lo que sugirió que existe una lenta y prolongada liberación del antígeno en este sistema en comparación con su forma soluble. En el caso de *Somavarapu et al.*, concluyó que al administrar ovoalbúmina encapsulada en partículas de PLA la respuesta inmune obtenida fue mejor; en otro estudio realizado en ratas las nanopartículas hechas de copolímero de bloque PLA-PEG y utilizando toxoide tetánico como antígeno, mostraron una mejoría en el transporte del antígeno en la mucosa, además de prolongar el tiempo del antígeno en la circulación sanguínea después de la administración nasal. (15,17,45)

### 6.6.9. Quitosano

Es un polisacárido lineal conformado por unidades de N-acetilglucosamina y D-glucosamina, obtenido mediante la N-desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de crustáceos como cangrejos, langostas y camarones. Posee un grupo amino y dos grupos hidroxilo, el primero le permite unirse a sistemas con carga negativa, dicha característica le permite interactuar con las mucinas presentes en la mucosa nasal por diferencia de cargas, facilitando el transporte paracelular de macromoléculas hidrofóbicas al abrir uniones estrechas en el epitelio mucoso, por lo anterior actúa como un fuerte mucoadhesivo y potenciador de la permeación, aunado a que es biocompatible y de baja toxicidad (Fig.27)



**Figura 27.** Proceso de obtención de quitosano. Adaptado de <https://www.acenologia.com/brett-quitosano-origen-fungico-cienc174-0220/>

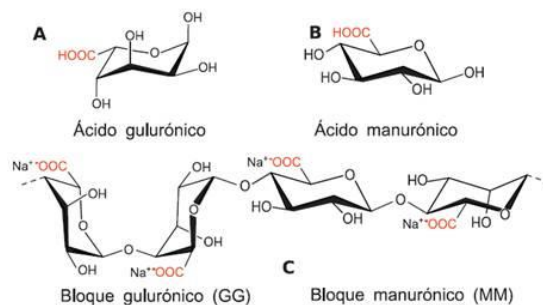
El quitosán tanto en formulaciones líquidas como sólidas, ha mostrado un buen potencial para la entrega de una variedad de antígenos en la mucosa nasal, como lo son: proteínas, toxinas recombinantes, hemaglutinina, plásmidos de DNA, etc.

Se han estudiado diversos sistemas que incluyen el quitosán como adyuvante en vacunas intranasales; tal es el caso de las nanopartículas que de acuerdo con diversos autores que han usado como antígeno el toxoide tetánico, la ovoalbúmina y el virus de la influenza, han tenido una eficiente liberación y posterior presentación del antígeno hacia las CPA's, así como una alta producción de inmunoglobulinas IgA e IgG. (15,17,45)

#### 6.6.10. Alginato y dextrano

Los polímeros bioadhesivos de origen natural como el dextrano y el alginato de sodio pueden prolongar su tiempo de residencia en la cavidad nasal, por lo cual han sido evaluados como posibles adyuvantes en la inmunización.

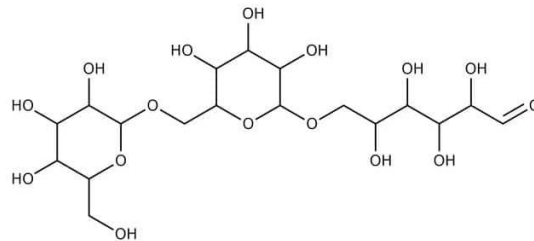
El alginato es un polisacárido aniónico obtenido a partir de las macroalgas pardas y está principalmente compuesto por los ácidos  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico, los cuales se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la estructura de la cadena polimérica. Por lo anterior es biocompatible y biodegradable; además de poseer propiedades mucoadhesivas, el cual forma un gel al reticularse con cationes divalentes o trivalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y el aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) y así formar depósitos con el antígeno adsorbido. (Fig.2.



**Figura 28. Estructura química del alginato.** Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2020000300276&script=sci\\_arttext#B4](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2020000300276&script=sci_arttext#B4)

*Tafaghodi et al.* evaluó la formulación de una vacuna en polvo seco con toxoide tetánico encapsulado en microesferas de alginato para inmunización intranasal en conejos, quien observo una inducción de la respuesta de anticuerpos IgG a nivel sistémico y de IgA a nivel mucosa.

El dextrano es un polisacárido de alto peso molecular, compuesto de unidades de D-glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos, por lo general se obtiene de la fermentación de bacterias lácticas como: *Streptococcus*, *Acetobacter* o *Leuconostoc*, en medios que contienen sacarosa.



**Figura 28.** Estructura química del dextrano. Recuperada de <https://www.fishersci.es/shop/products/dextran-mp-biomedicals-17/11490676>

*Sajadi Tabassi et al.*, estudio el efecto del toxoide tetánico encapsulado en microesferas de dextrano reticulado con el adyuvante CpG oligonucleótido en conejos inmunizados mediante la vía intranasal; llegando a la conclusión de que induce una fuerte respuesta inmune sistémica y mucosa que resulta en la producción de inmunoglobulinas IgG e IgA. (45)

## 6.7. Citocinas

Las citocinas juegan un papel importante en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, es por ello que han sido objeto de estudio como posibles adyuvantes inmunoestimuladores, las cuales se detallan a continuación:

**Interleucina 2 (IL-2):** Se ha utilizado como adyuvante en vacunas, por su capacidad de estimular la proliferación y activación de linfocitos T, células B, NK y



macrófagos. Ha demostrado inducir el reclutamiento de células inmunes al sitio de inyección, activando monocitos, CD y la expresión del CPH II.

**Interleucina 12 (IL-12):** Esta tiene la capacidad de estimular la respuesta inmune de los linfocitos Th1.

**Interleucina 15 (IL-15):** Su papel radica en incrementar la actividad de linfocitos CD8+ y en producir proteínas antiapoptóticas.

**Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF):** Mejora la respuesta inmune mediante la activación y el reclutamiento de las CPA's.

**Interferón alfa (IFN- $\alpha$ ):** Estimula la maduración de células dendríticas, incrementa la presentación de péptidos por el CPH I y por ende la activación de células Tc CD8+.

Aunque las citocinas parecen ser un adyuvante ideal para activar la respuesta inmunitaria, presentan algunas desventajas como son: toxicidad a dosis relativamente bajas, son inestables por su naturaleza proteica, tienen una vida media relativamente corta e involucran un alto costo para su producción. (42,45)

## **6.8. Sistemas de adyuvantes**

En los últimos años ha surgido una tendencia hacia la fabricación de sistemas de adyuvantes, basados en combinaciones de los mismos que intentan potenciar el efecto de cada uno de ellos por separado frente a un antígeno. (45,59,60)

### **6.8.1.AS04**

Este sistema consiste en la combinación de dos adyuvantes, el MPL y sales de aluminio, las más comunes son  $Al(OH)_3$  y  $AlPO_4$ .

Su mecanismo de acción se basa en la estimulación directa del receptor TLR-4, que conduce a una activación y maduración de las CPA's que migran hacia los ganglios linfáticos, además se induce la producción de citocinas proinflamatorias

como TNF- $\alpha$ , la activación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$  y por último la activación de linfocitos T y linfocitos B (anticuerpos y linfocitos de memoria).

En este sistema las sales de aluminio se encargan de estabilizar la presencia del MPL y del antígeno, para después proceder a modular y prolongar la respuesta de citocinas generada por el MPL en el sitio de administración.

Posee un adecuado perfil de seguridad, por lo que ya ha sido aprobado para su uso por la FDA y la Unión Europea.

Las vacunas que actualmente cuentan con licencia para utilizar el AS04 como adyuvante son: Cervarix<sup>®</sup>, diseñada contra el VHP que contiene como antígeno purificado el VPH16 y 18, y la vacuna Fendrix<sup>®</sup>, diseñada frente al virus de Hepatitis B, ambas son fabricadas por la farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) y su administración es mediante la vía intramuscular. (45,59,60)

#### **6.8.2.AS01**

Es una formulación liposomal compuesta por MPL y saponinas (QS-21).

Su mecanismo de acción estudiado radica en la producción de respuestas humoral (linfocitos B) y celular (por parte de linfocitos T CD8+). Se estudia su inclusión en vacunas frente a la malaria (Mosquirix), VIH. Actualmente se encuentra comercializada una vacuna frente al Herpes Zoster (Shingrix) desarrollada con subunidades del virus (glicoproteína E recombinante) y el AS01. (59,60)

#### **6.8.3.AS02**

El adyuvante AS02 contiene 50  $\mu\text{g}$  de monofosforil lípido A (MPL) y 50  $\mu\text{g}$  de QS-21, 250  $\mu\text{l}$  de SB62 (emulsión de aceite / agua) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por volumen de 0.5 mL.

Se ha demostrado que MPL y QS21 son sinérgicos para producir anticuerpos y para mejorar la respuesta de linfocitos Th1 y Tc contra una proteína exógena. Es un sistema potente y se usa en varias vacunas contra agentes patógenos complejos como *Pladmodium falciparum*, el VIH y *Mycobacterium tuberculosis*. (59,60)

## **Capítulo 7. Conclusiones**

En el presente trabajo se explicaron los adyuvantes más representativos utilizados en vacunas intranasales; principalmente se abordaron sus mecanismos de acción en el sistema inmunitario, así como las ventajas y desventajas que presenta cada uno.

Se describió a grandes rasgos como es que esta conformado el sistema inmune y como es la participación del mismo tras la administración de una vacuna intranasal destacándose principalmente la generación de una respuesta inmune a nivel sistémico como a nivel de mucosas, de esta última se abordó a profundidad como es que se lleva a cabo la mucoadhesión.

Se presentaron las características mas representativas de la vía nasal y como es que los factores fisiológicos, de la formulación y del dispositivo de administración afectan la absorción de una molécula.

Todo esto en conjunto permite concluir que la respuesta inmune obtenida tras la administración de una vacuna vía intranasal va a depender de factores como: las características del antígeno, características biológicas de la cavidad nasal, la forma farmacéutica, el diseño de la formulación, el dispositivo empleado y claramente de la correcta elección del adyuvante.

## **Capítulo 8. Perspectivas**

La evolución de las enfermedades actuales y su rápida propagación ha llevado a la necesidad de buscar opciones más eficientes para el tratamiento de estas, como se revisó, las vacunas además de proteger al cuerpo ante el primer contacto también tienen como finalidad la creación de una inmunidad de memoria.

Debido a lo anterior se ha llegado a una necesidad de crear adyuvantes que asistan a los antígenos con el fin de potenciar su capacidad inmunogénica. Sin embargo, hasta la fecha, muy pocos han sido aprobados para uso humano, siendo los efectos secundarios y la toxicidad los principales impedimentos, razón por la

que se debe seguir investigando a profundidad el mecanismo de acción que emplean los adyuvantes, esto permitirá crear compuestos con efectos inmunológicos más potentes y específicos, además de mejorar la eficacia de los ya existentes en el mercado, además se deben considerar los factores que afectan la inmunogenicidad tales como la diana a las que va dirigido, la vía de administración, la relación estructura actividad, así como la optimización del proceso.

Si bien existen varias propuestas de adyuvantes para vacunas intranasales estos aún están en estudios clínicos; a la fecha solo una vacuna intranasal ha sido aprobada para el tratamiento de la influenza estacional utilizando MF59™ como adyuvante por lo que la tendencia hacia el futuro continua en la necesidad de buscar nuevos sistemas de entrega del adyuvante y los antígenos, esto con el fin de disminuir las dosis tanto del antígeno, como del propio adyuvante a administrar lo que se traduciría en un costo-beneficio para que el gobierno pueda tener el control de enfermedades en la población.

## Referencias

- 1) Manual de vacunas en línea de la Asociación Española de Pediatría. Capítulo 47. Inmunología y vacunas.
- 2) Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P.V., & Clark, D.P. (14 ed). (2015). Brock. Biología de los Microorganismos. *PEARSON EDUCACIÓN*. 792-798, 826-833.
- 3) Leticia Cedillo, B. A., López G. M., & Gutiérrez C.B. (2015). ¿Qué es y cómo funciona el sistema inmune? *Ciencia. Academia Mexicana de Ciencias*. 66(2), 18-25.
- 4) Abbas, Abul K. (2008), Propiedades generales de las respuestas inmunitarias. *Inmunología celular y molecular* (6° ed., pp. 01-17). Elsevier.
- 5) García, M.C.H. (2017). Vacunas de ARN: la más prometedora generación de vacunas. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, 26, 16-19.
- 6) <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination> [Consulta 03/ 07/2022]
- 7) <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types> [Consulta: 03/07/2022]
- 8) <https://www.hhs.gov/es/immunization/basics/types/index.html> [Consulta 03/07/2022]
- 9) Jabbal-Gill I. (2010). Nasal vaccine innovation. *Journal of drug targeting*, 18(10), 771–786.
- 10) [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32903/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32903/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y) [Consulta 09/07/2022]
- 11) Mancipe, L.F, Ramírez, G.N., Jairo, J.C., & Vera, V.A. (2011). Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. *NOVA: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 9, 83-93.
- 12) Roldán, M. O. (2008). Introducción al cultivo celular. En Catedra de Biología Celular- FBQF- UNT, Cultivos celulares (1 ed.), 01-04.
- 13) Mato, Y. L. (2019). Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 1-9.

- 14) Zaman, M., Chandrudu, S., & Toth, I. (2013). Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug delivery and translational research*, 3(1), 100–109.
- 15) Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced drug delivery reviews*, 61(2), 140–157.
- 16) Sharma, S., Mukkur, T. K., Benson, H. A., & Chen, Y. (2009). Pharmaceutical Aspects of Intranasal Delivery of Vaccines Using Particulate System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(3), 812–843.
- 17) Köping-Höggård, M., Sánchez, A., & Alonso, M. J. (2005). Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert review of vaccines*, 4(2), 185–196.
- 18) Tortora, G. J & Derrickson, B. (13 ed). (2013). Principios de Anatomía y Fisiología. EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA. 918-922.
- 19) Gizurarzon, S. (2012). Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. *Current Drug Delivery*, 9, 566-582.
- 20) Ugwoke, M. I., Agu, U. A., Verbeke, N., & Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1640-1665.
- 21) Dhakar, R. C., Maurya, S. D., Tilak, V. K., & Gupta, A. K. (2011). A review on factors affecting the design of nasal drug delivery. *International Journal Of Drug Delivery*, 3(2), 194-208.
- 22) Arora, P., Sharma, S., & Garg, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(18), 967-975.
- 23) Gizurarzon, S. (2015). The Effect of Cilia Clearance on Successful Drug Delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(4), 497-506.
- 24) Kharenko, E. A., Larionova, N. I., & Demina, N. B. (2009). Mucoadhesive drug delivery systems (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43(4), 21-29.
- 25) Kaur, P., Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2016). In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal

- membrane. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(4), 1167-1176. doi: 10.3109/21691401.2015.1012260
- 26)Bahadur, S., & Pathak, K. (2012). Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. *Expert Opinion. Drug Delivery*, 9(1), 19-31. doi: 10.1517/17425247.2012.636801
- 27)Remigius, A. (2016). Challenges in nasal drug absorption: how far we come. *Therapeutic Delivery*, 7(7), 495-510.
- 28)Shaikh, R., Singh, T. R. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 89-100.
- 29)Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1556-1568. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.001
- 30)Bassi da Silva, J., De Souza Ferreira, S. B., De Freitas, O., & Bruschi, M. L. (2017). A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *DRUG DEVELOPMENT AN INDUSTRIAL PHARMACY*, 43(7), 1053-1070. doi: 10.1080/03639045.2017.1294600
- 31)Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Duodécima edición.
- 32)Keller, L.A., Merkel, O., & Popp, A. (2021). Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Delivery and Translational Research*,12(4),735-757.
- 33)Misra, A., & Kher, G. (2012). Drug Delivery Systems from Nose to Brain. *Current Pharmaceutical Biotechnology*,13, 2355-2379.
- 34)Prajapati, M., Mandloi, R., Pillai, S., & Birla, N. (2020). The Review on The Nasal Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(2),1-18.

- 35) Xu, J., Tao, J., & Wang, J. (2020). Design and Application in Delivery System of Intranasal Antidepressants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1-13.
- 36) Djupesland, P.G. (2013). Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective - a review. *Drug Delivery and Translational Research*, 3, 42-62.
- 37) Kolhe, P., Shah, M., & Rathore, N. (2013). Sterile Product Development. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 99-144.
- 38) <https://drugdeliversystems.bd.com/products/prefillable-syringe-systems/vaccine-syringes/accuspray-nasal-spray-system> [Consulta 19/02/2022]
- 39) <https://www.optinose.com/exhalation-delivery-systems/technical-overview> [Consulta 19/02/2022]
- 40) [http://www.kurvetech.com/devices\\_vianaseid.asp](http://www.kurvetech.com/devices_vianaseid.asp) [Consulta 19/02/2022]
- 41) Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 106-114.
- 42) Cárdenas-Vargas, A., Pedroza-Roldán, C., & Elizondo-Quiroga, D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(3), 29-47.
- 43) Rubido, J. A., & Leal, M. A. (2000). Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología aplicada*, 17(3), 147-160.
- 44) Baylor, N. W., Egan, W., & Richman, P. (2002). Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine*, 20 Suppl 3, S18-S23.
- 45) Wang, S., Liu, H., Zhang, X., & Qian, F. (2015). Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein & cell*, 6(7), 480-503.



- 46) Franco, D. A., Giraldo, M. L., & Patiño, P. J. (2004). Papel de los adyuvantes en la modulación del sistema inmune. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(3), 280-289.
- 47) Gursel, M., & Klinman, D. M. (2015). Use of CpG Oligonucleotides as Mucosal Adjuvants. *Mucosal Immunology: Fourth Edition*. 1. 1201-1209.
- 48) Schultze, V., D'Agosto, V., Wack, A., Novicki, D., Zorn, J., & Hennig, R. (2008). Safety of MF59™ adjuvant. *Vaccine*, 26, 3209-3222.
- 49) Garçon, N., Vaughn, D., & Didierlaurent, A.M. (2012). Development and evaluation of AS03, and Adjuvant System containing  $\alpha$ -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion, *Expert Review of Vaccines*, 11(3), 349-366.
- 50) <https://www.vaccineformulationinstitute.org/activities/swe-adjuvant/>  
[Consulta 25/06/2022]
- 51) De Jonge, J., Van Dijken, H., De Heij, F. *et al.* (2020). H7N9 influenza split vaccine with SWE oil-in-water adjuvant greatly enhances cross-reactive humoral immunity and protection against severe pneumonia in ferrets. *npj Vaccines*, 5(38), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0187-4>
- 52) Ventura, R., Brunner, L., Heriyanto, B., de Boer, O., O'Hara, M., Huynh, C., Suhardono, M., *et al.* (2013). Technology transfer of an oil-in-water vaccine-adjuvant for strengthening pandemic influenza preparedness in Indonesia. *Vaccine*, 31, 1641-1645.
- 53) Petrovsky, N., Copper, P.D. (2015). Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety, *Vaccine*, 33(44), 5290-5296. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.030.
- 54) Hayashi, M., Aoshi, T., Haseda, Y., Kobiyama, K., Wijaya, E., Nakatsu, N., Igarashi, Y., *et al.* (2016). Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines. *eBioMedicine*, 15, 127-136.

- 55)Heurtault, B., Frisch, B., & Pons, F. (2010). Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert opinion on drug delivery*, 7(7), 829–844.
- 56)Hu, K., Lovgren-Bengtsson, K., & Morein, B. (2001). Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51, 149-159.
- 57)Burt, D., Mallett, C., Plante, M., Zimmermann, J., Torossian, K., & Fries, L. (2011). Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines: advantages, progress and future considerations. *Expert Reviews Vaccines* 10 (3), 365-375.
- 58)von Hoegen, P. (2001). Synthetic biomimetic supra molecular Biovector (SMBV) particles for nasal vaccine delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 51(13), 113–125.
- 59)Garçon, N., Chomez, P., & Van Mechelen, M. ((2007) GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 723-739. doi: [10.1586/14760584.6.5.723](https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.723)
- 60)Garçon, N., & Van Mechelen, M. (2011) Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems. *Expert Review of Vaccines*, 10(4), 471-486. doi: [10.1586/erv.11.29](https://doi.org/10.1586/erv.11.29)