

ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS PARA VACUNAS HUMANAS: ESTADO ACTUAL, TENDENCIAS MUNDIALES Y EN CUBA.

Gustavo Sierra González y Beatriz Tamargo Santos

Resumen

La contribución de las vacunas a la salud pública mundial ha sido gigantesca sobre todo en el campo de la profilaxis de enfermedades infecciosas, particularmente en la era moderna de la vacunación en el pasado siglo XX y lo que va del presente. El alcance del concepto y las tecnologías de las vacunas se ha ampliado a la terapéutica, además de las enfermedades infecciosas crónicas como la papilomatosis y el herpes, al cáncer, las enfermedades autoinmunes, las degenerativas y las alérgicas. El principal obstáculo para avanzar hacia una nueva generación de vacunas, que brinde soluciones a los grandes problemas pendientes y permita mejorar algunas de las existentes, lo constituyen los adyuvantes inmunológicos para vacunas. Desde su introducción y por más de 80 años solo se emplearon los adyuvantes derivados de sales de aluminio en las vacunas humanas registradas y empleadas masivamente. Siendo en las últimas dos décadas que se ha iniciado con éxito una nueva era de la Vacunología al registrarse algunas vacunas con nuevos adyuvantes. Los adyuvantes que contienen aluminio a pesar de sus resultados positivos acumulados tienen limitaciones, dadas por el alcance de sus mecanismos de potenciación y direccionamiento de la respuesta inmune, solo se adecuan a ciertas aplicaciones; por otro lado cada vez más aparecen preocupaciones por sus riesgos potenciales, aunque no todos bien demostrados, para la seguridad de la vacunación, sin embargo no pueden ser cambiados ni abandonados bruscamente. Avances recientes en el entendimiento de las relaciones entre los mecanismos de reconocimiento de los agentes patógenos, las señales internas de daño y la activación de la respuesta inmune innata, con un papel determinante en la consecuente generación de una respuesta inmune adaptativa adecuada, han arrojado claridad sobre la esencia del fenómeno de la adyuvación de la respuesta inmune, avizorándose una época de intensa productividad en ese campo aplicado a la inmunoterapia, es por ello que en el presente trabajo revisaremos con más detenimiento estos aspectos. Brindamos, así mismo un breve recuento sobre los principales avances de las Ciencias Biomédicas en Cuba en relación a las investigaciones aplicadas a los adyuvantes para vacunas humanas, incluyendo nuestros propios resultados.

Palabras clave: vacunas, adyuvantes, respuesta inmune innata y adaptativa.

Abstract

The contribution of the vaccines to the public health worldwide has been giant-sized, most of all at the field of the prophylaxis of infectious diseases, particularly in the modern era of vaccination in the past XXth century and what goes from the present XXIth. The reach of the concept and the technologies of the vaccines,

first limited to the infection prophylaxis, have widened to the therapeutic field, chronic diseases like the papilomatosis and the herpes, the multiform cancer entities, the autoimmune diseases, the degenerative and the allergic diseases, are now vaccine targets. New and better adjuvant for vaccines constitute the principal obstacle to advance toward a new generation of vaccines, that could offer solutions to the big pending problems of diseases without vaccines and allow to improve some of them existent with limited efficacy. The only approved and massively used adjuvants in human vaccines during decades, for over 80 years, were those based on aluminum salts. Being in the last two decades than has started up a new era in the Vaccinology when some vaccines with new adjuvants were getting registered and used with success. The adjuvants based only on aluminum salts in spite of its accumulated positive results, have limitations, given for the reach of its mechanisms of potentiating and driving of the immune response. In addition more and more concern for its potential toxicological risks appears, although not all well demonstrated. Alum adjuvants are suitable only for certain applications. However, in order to assure affordability of vaccines for all needs and the continuity of vaccination, Alum adjuvants cannot be changed neither abandoned brusquely. Recent advances in the understanding of the relations between the mechanisms of recognition of pathogens and the internal signs of damage and the activation of the innate immune response, with a determining function in the consequent generation of a given adaptive immune response, made suitable and evident the essence of the phenomenon of the adjuvation processes of the immune response. On this basis it's possible to foresee an epoch of intense productivity obtaining new and better adjuvants and its applications. Based on the relevance of the afore-mentioned topics we are going to check with more thoroughness these aspects in the present work. Also, we will offer to the readers likewise a brief reviewing on the principal advances of the Biomedical Sciences in Cuba in relation to the applied investigations on adjuvants for human vaccines, including our own results.

Key words: vaccines, adjuvants, innate and adaptive immune responses.

INTRODUCCION

Ningún otro desarrollo de las Ciencias Biomédicas ha tenido un impacto beneficioso sobre la salud mundial comparable al de las vacunas, gracias a su empleo, solo en el Siglo XX y lo que va de este, han sido controladas 12 de las mayores enfermedades humanas; viruela, poliomielitis, difteria, tétanos, fiebre amarilla, tos ferina, *Haemophilus influenzae b*, sarampión, rubéola, paperas, rabia, fiebre tifoidea y están en camino del control, varios tipos de meningitis y otro grupo de enfermedades infecciosas. La viruela fue erradicada en 1979, después de 30 años de vacunación, la poliomielitis se ha llevado próxima a la erradicación global (1). Así mismo, zoonosis y enfermedades animales de gran impacto en la vida del planeta han sido controladas, el caso más notable es la erradicación de la Peste Bovina en agosto de este mismo año 2011 (2,3). Este resultado es, después de la erradicación de la viruela, el segundo evento de este tipo a nivel mundial, lográndose barrer de la faz de la tierra completamente una enfermedad que ha tenido un impacto significativo, no solo desde el punto de vista económico sobre la vida del hombre sino también por su importancia científica, al quedar demostrado que el virus del sarampión evolucionó a partir del virus de la peste bovina, durante una de las epidemias en los siglos XI y XII (4). También el virus del moquillo canino está estrechamente relacionado en esas encrucijadas evolutivas.

Sin embargo no ha sido igual el éxito de la investigación en vacunas frente al reto impuesto por algunos agentes patógenos como los virus del SIDA y la Hepatitis C, los parásitos causantes de la Malaria, la Shistosomiasis, la Enfermedad de Chagas, o el bacilo de la Tuberculosis. Más recientemente el concepto de vacuna se ha ampliado y se aplica a la terapéutica, además de las enfermedades infecciosas crónicas, del cáncer, de las enfermedades autoinmunes, degenerativas y alérgicas, por lo que el reto, que deben enfrentar los que desarrollan nuevas vacunas y sus adyuvantes, crece.

Las vacunas hoy son preparados farmacéuticos, de elevada complejidad, formados por un grupo de sustancias (antígeno; simple o compuesto, adyuvante, preservante y vehículo) y destinados a hacer que el sistema inmune responda ante una invasión de un microorganismo (bacteria, virus, o parásito) un cáncer o ante otras entidades patógenas o mecanismos naturales dañados como los causantes de autoinmunidad, alergia o degeneración nerviosa. Una vacuna ayuda a las defensas del organismo a reconocer y destruir las células cancerosas o los microorganismos invasores y a neutralizar a sus toxinas o a interferir en los mecanismos naturales dañados. Según su uso las vacunas pueden ser profilácticas o terapéuticas.

Para lograr la metas de las vacunas debe generarse una importante respuesta inmune empleando como antígenos, moléculas o complejos cada vez más puros obtenidos por síntesis químicas o ingeniería genética sin la contribución potenciadora que tienen los extractos de gérmenes salvajes, o los gérmenes mismos enteros inactivados o atenuados por otra parte el amplio abanico de empleo del concepto y las tecnologías de las vacunas hace que los blancos de las aplicaciones no se limiten solo al aumento de un tipo de respuesta de anticuerpos, sino al direccionamiento y manipulación de la respuesta hacia variados y complejos mecanismos que pueden involucrar numerosas

subpoblaciones celulares y moleculares del sistema inmune para lograr el efecto requerido.

En un siglo de éxitos rotundos de la Vacunología todo se ha logrado en los primeros 80 años, usando los adyuvantes derivados de sales de aluminio (5-9), los cuales poseen limitaciones (10-13), solo algunas pocas vacunas se han desarrollado en los últimos 20 años con nuevos adyuvantes, que tampoco cubren todas las necesidades (14-17).

Podemos decir sin lugar a equivocarnos que en estas últimas décadas los adyuvantes han sido y son el principal obstáculo a vencer para avanzar hacia una nueva generación de vacunas que resuelva el problema de las enfermedades que aún carecen de vacunas efectivas y además pueda mejorar algunas de las vacunas clásicas que más lo requieran.

Los adyuvantes inmunológicos, también denominados inmunopotenciadores o inmunomoduladores, son sustancias que se añaden a la formulación farmacéutica de las vacunas para aumentar, acelerar o prolongar su inmunogenicidad, es decir, la respuesta del sujeto vacunado a los antígenos que componen el núcleo o elemento definitorio de la especificidad de la vacuna.

Más recientemente se ha comprobado que, tanto o más importante que el aumento de la intensidad de la respuesta, es el direccionamiento de la misma hacia uno o varios de los componentes y/o mecanismos que la estimulan; es decir si aumenta fundamentalmente una respuesta mediada por anticuerpos y cuáles de sus clases y subclases son las que más se incrementan, o si aumenta más la respuesta mediada por células cuales serían dichas células, si es a predominio de clones de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) o si son subpoblaciones de linfocitos T helper o ayudadores y cuál de sus variantes Th1, Th2, Th3, Th17, etc., o por el contrario predomina en la respuesta el tipo de linfocito regulatorio (Treg). Cada uno de estos patrones de respuesta tiene bien definidos sus participantes, marcadores sobre cada tipo celular y sus moléculas mediadoras características; tales como citoquinas, quimoquinas u otras. Particular importancia revisten para calificar de ideal un adyuvante, la duración de la respuesta protectora específica o memoria inmunológica, la reducción de la cantidad y número de dosis del antígeno necesarias para inducir la respuesta protectora, la capacidad de inducir protección en sujetos envejecidos o inmunodeprimidos y el balance entre su eficiencia y reactogenicidad/seguridad local y sistémica, aguda y a largo plazo.

Motivado por los descubrimientos relativamente recientes, que han permitido entender mejor cómo la inmunidad innata influencia de manera decisiva la inmunidad adaptativa, se ha producido un punto de inflexión en los esfuerzos por obtener nuevos adyuvantes, que ha abierto posibilidades jamás disponibles en el arsenal de conocimientos, para poder manipular la respuesta inmune de manera racional. Una gran avalancha de trabajos inunda las revistas principales sobre el tema, abordando estas estrategias moleculares de manipulación a través de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs, siglas del inglés) de las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) de la inmunidad innata, que reconocen un rango estrecho de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, siglas del inglés) y que direccionan su reconocimiento, así activan y modulan el tipo de respuesta de la inmunidad adquirida más eficiente.

El presente trabajo pretende brindarles a los lectores una sucinta revisión de los conocimientos sobre mecanismos de acción de los adyuvantes, tanto los clásicos que se han venido acumulando, como los más recientemente obtenidos. De manera breve examinamos el estado de esta temática en Cuba.

MECANISMOS DE ACCION DE LOS ADYUVANTES. INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA COMO BASES DE LOS ADYUVANTES.

Los avances de la Inmunología, que dejan esclarecidos los vínculos moleculares entre inmunidad innata y adquirida, se han convertido sin dudas en los blancos preferidos del diseño racional de la nueva generación de adyuvantes vacunales; a la vez que permiten esclarecer una buena parte del modo de acción de los adyuvantes más tradicionales.

El Sistema Inmune de los mamíferos está integrado por dos sub-sistemas estructurales relacionados en cuya integración se logra cumplir la función protectora de las defensas inmunológicas. La primera “trinchera” de las defensas y la que, de manera inmediata entra en “combate” está formada por los mecanismos y estructuras de la Inmunidad Innata, ahí se detecta primero y se identifica después, en lo esencial al “enemigo atacante”, esta información amplificada por las demás consecuencias de las “primeras batallas”, permite activar al segundo sub-sistema de las defensas las cuales son ya más desarrolladas evolutivamente y específicas para el tipo de “agresor”.

El sub-sistema de la respuesta inmune innata detecta, captura y destruye a los microbios invasores usando para ello las capacidades de células fagocíticas tales como los macrófagos. Esta respuesta tiene lugar rápidamente y en ese proceso se obtiene la información “que es pasada” al sub-sistema de la inmunidad adquirida la cual sí requiere de varios días a semanas para desarrollarse y completarse; como resultado de la misma, se completa la destrucción del “agresor” y se guarda la memoria necesaria para que, en un segundo “ataque” del mismo “agente agresor” la respuesta total se pueda “orquestrar” de manera más inmediata y según un programa de respuestas pre-montado.

En libros clásicos de Inmunología hasta no hace mucho tiempo, se enseñaba que el Sistema de la Inmunidad Innata mediaba un tipo totalmente inespecífico de respuesta inmune y que era independiente del Sistema de la Inmunidad Adquirida.

Hace relativamente poco tiempo, se demostró que las células de la inmunidad innata reconocen y responden con un determinado nivel de especificidad a todos los tipos y clases de agentes patógenos, “guiando” con dicha respuesta las acciones sucesivas de la respuesta inmune adquirida. La capacidad de reconocimiento, durante la interacción inicial con el agente patógeno por parte de la inmunidad innata, de los Patrones Moleculares Específicos de Patógenos (PAMPs) (17-19), lo hacen con las estructuras que poseen las células de este sistema con esos fines, formadas por una familia de moléculas que actúan como receptores y que de manera general se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrones Específicos (PRR, siglas del inglés). Estos Receptores reconocen a los Patrones Moleculares Específicos de los Patógenos como señales de peligro, fundamentalmente exógenos, así como a Patrones

Moleculares Asociados a Peligros con sus siglas más usadas del inglés (DAMPs) (18) fundamentalmente endógenos y desencadenan la iniciación de un conjunto de respuestas aún más específicas al activarse el sistema de la respuesta inmune adquirida, (Figura 1). De esta manera, quedó evidenciada la base del fenómeno observado durante tantos años empíricamente, al inmunizar animales o personas con vacunas vivas atenuadas o vacunas basadas en gérmenes completos inactivados; la adyuvanticidad de estas vacunas se debe a la conservación en las mismas de los PAMPs en los microorganismos de origen; esta “adyuvancia” intrínseca o natural de los gérmenes enteros se pierde cuando las sub unidades antigénicas son purificadas y sacadas del contexto por los diversos métodos de la vaccinología moderna, en busca de vacunas de mayor nivel de definición estructural y para asegurar su calidad, (controlabilidad y consistencia), a la vez que disminuir su reactogenicidad, según las crecientes exigencias regulatorias. Es en este punto, donde el desarrollo de efectivos y seguros adyuvantes vacunales cobra una importancia estratégica, hasta convertirse en el mayor obstáculo para el desarrollo de la mayoría de las vacunas humanas aún pendientes o en vías de obtención.

Por todo lo anterior resulta evidente que el mecanismo de acción fundamental o básico, de la inmensa mayoría de los adyuvantes vacunales derivados de microorganismos, consiste en la participación de los mismos en la presentación de los antígenos que forman parte del núcleo de especificidad de la vacuna, que en asociación con los PAMPs, del o los microorganismos, componen el adyuvante; de esta manera se desencadenan primero los mecanismos de reconocimiento por la inmunidad innata y a continuación se activan los mecanismo finales de protección mediante la inmunidad adquirida. Este tipo de adyuvantes resuelve por ejemplo, el problema de la pobre inmunogenicidad de antígenos vacunales muy puros obtenidos por ingeniería genética o por síntesis de péptidos o de otras oligoestructuras.

De la familia o familias de PRRs las más prolijamente estudiadas han sido sin dudas los TLRs, del inglés, Toll Like Receptors. Estos fueron originalmente descubiertos en las investigaciones fundamentales con *Drosophila* habiéndose demostrado que éstos se requerían para orquestar mecanismos de defensa específicos de ésta mosquita de las frutas, después se vio que TLR estructural y funcionalmente muy similares, se fueron encontrando en diferentes especies de vertebrados, hasta en el propio hombre (19-21, 32-34). Para ampliar e integrar el concepto de “familias de PRRs” consulte la Tabla I, sobre los más estudiados PRRs y los correspondientes ligandos de PAMPs y DAMPs.

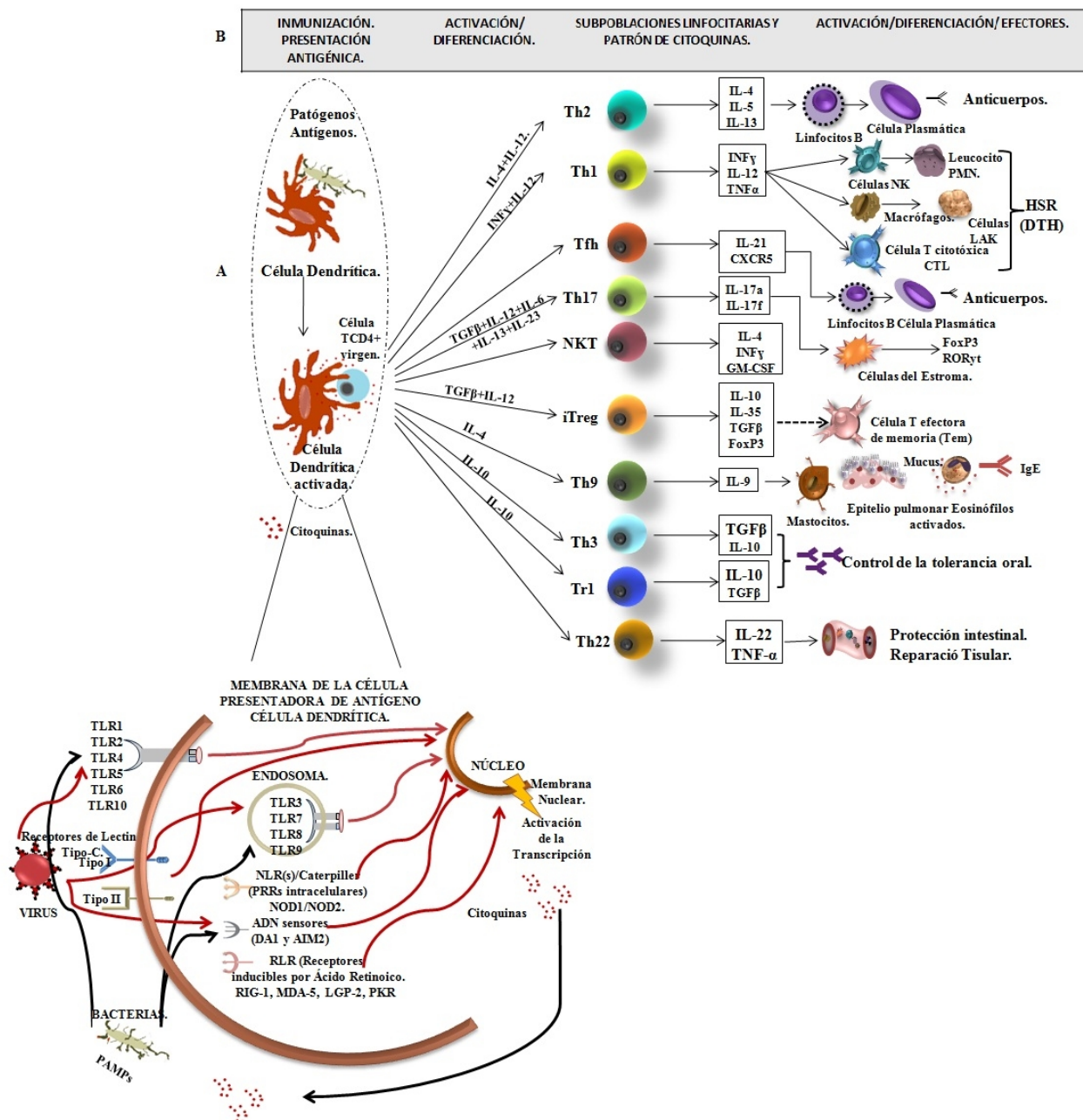


Figura 1: Dibujo que representa los mecanismos de activación de las respuestas inmune innata y adaptativa estimulados por los adyuvantes.

A: El microambiente logrado, debido a la estrecha relación entre la célula dendrítica (CD) y el linfocito virgen TCD4⁺, es determinado por los resultados de la activación de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) de esa célula dendrítica con los Patrones Moleculares de Patogenicidad (PAMPs) de los gérmenes y otras señales internas y externas de peligro (DAMPs). El reconocimiento de esos patrones y la selección del tipo general de activación de mejor acople lo determinan los PRRs y sus ligandos. Múltiples vías enzimáticas, llevan sus señales hasta el núcleo de la CD, donde se activan los factores de transcripción y los genes de las citoquinas, las cuales determinan el patrón de linfoquinas y el tipo de respuesta inmune predominante. **B:** Vista general de la estimulación y diferenciación de los linfocitos TCD4⁺, por las CD y otras células presentadoras de antígenos profesionales (CPA), después del encuentro con el agente patógeno o el antígeno vacunal derivado de él. El germen o la formulación vacunal son procesados y los péptidos resultantes presentados por las Moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II), lo que aporta la señal 1 y los co-receptores con las moléculas co-estimuladoras aportan la señal 2. El tipo de citoquina

que se produce, de manera dominante, como resultado de la activación del linfocito TCD4⁺ virgen (Th0), determina el ambiente de diferenciación hacia una sub-población u otra de linfocitos T auxiliares (Th) y el tipo de respuesta inmune adaptativa que predominará. Basado en las referencias 17-21, 32-34 y 144-149. Dibujo Original de los autores COPYRIGHT.

Tabla I: Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) y sus ligandos DAMPs y PAMPs.

Receptores (PPRs)	Ligandos DAMPs y PAMPs	
	Exógenos	Endógenos
TLRs humanos		
TLR 1/TLR2	Triacil-lipopéptidos (<i>Neisseria</i> y <i>Micobacteria</i>).	α-Defensinas.
TLR2	Porinas, GPI-mucina, péptidoglicano, lipoproteínas, Lipoarabinomanano, fosfolipomanano, zymosan, α-glicano, glicoproteínas de envoltura (bacterias Gram + y Gram -, <i>Micobacteria</i> , <i>Neisseria</i> , virus, protozoos y hongos)	Proteína A surfactante.
TLR2/ TLR 4	Glucuronoxilomanano (C. <i>Neoformans</i>)	HSP60, HSP70, Gp96, HMGB1, Proteína D surfactante, amiloide A biglicano.
TLR2/TLR6	Diacil-lipopéptidos, ácido lipoteicoico. <i>Micobacterias</i> y bacterias Gram +.	Versican.
TLR3	ds RNA	mRNA
TLR4	LPS, glicoproteínas de envoltura, glicoinositol, fosfolípidos, manano, (bacterias Gram -, virus, protozoos, cándidas)	Fibronectina, fibrinógeno, tenascin-C, neutrofilelastasa, lactoferrina LDL oxidada, ácidos grasos, fragmentos de heparansulfato y de ácido hialurónico.
TLR5	Flagelina Bacteriana	
TLR7/TLR8	ss RNA (virus de RNA)	ssRNA
TLR9	CpG DNA, hemozoil (virus, bacteria y protozoos)	Complejo IgG-cromatina
Lectinas tipo C.		
Dectina-1. Mincle	β-glucano (Hongos, Cándida) α-manosa (hongos) glicolípidos (<i>Micobacteria</i>) Trehalosa, dimicolato "Cord Factor"(Factor Cuerda)	SAP 130 de las células necróticas
DC-SIGN	N-acetilglucosamina, manano (HIV,SIV)	N-acetil glucosamina-manosa ICAM-2,ICAM-3

MMR	Manosa, fucosa (levadura)	Manosa, fucosa, Sialil, Lewis X.
DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Peligros		
HMGB1	Bajo estrés se libera → inflamación, lo liberan células necróticas no apoptóticas. Se hace pro inflamatoria al unirse a LPS, DNA o IL-1 β .	
S100 A8 /S100 A9	Proteínas que unen calcio. Activación del daño al cito esqueleto.	
SAA		Serum Amiloid A (Amiloide A del Suero), Proteínas de fase aguda, daño, inflamación, hepatocitos.
RLRs , CARDs (Sensores de DNA y RNA).		
DAI	DNA→IFN (virus)	DNA citosólico→INF
RIG-1	dsRNA corto,5TP-RNA (virus)	RNA citosolico→INF
MDA-5	dsRNA largo, (virus)	RNA citosolico→INF
NLRs: NOD-like receptors.		
NOD1	Péptidoglicanos, ácido diaminopimético (bacterias Gram-)	
NOD2	Péptidoglicanos, MDP, (bacterias Gram- y Gram+)	
NLRP1	MDP, Toxina letal de <i>B. ántrax</i> . Bacterias Gram+ y Gram- y toxinas bacterianas.	
NLRP3	RNA, DNA, MDP, toxinas bacterianas, sílica, asbesto, radiación UV, (virus, bacterias, ambiente).	ATP, ácido hialurónico, péptido B, amiloide, cristales de urato, glucosa extracelular aumentada, ROS.
IPAF	Flagelinas bacterianas.	

El contenido resumen de la tabla está basado en las referencias 17,18,19,20 21,23,24,25,26,27,28,29,30,31,135 y 136 no ésta expuesto exhaustivamente, solo para ejemplificar con fines de orientación y didácticos así como brindar una compilación útil realizada por nosotros. **GPI-Mucina**: Mucina anclada a glicosilfosfatidilinositol. **HSP**: Head Shock Proteins. **GP**: Glicoproteína. **LPS**: Lipopolisacárido. **CpG**: C-fosfato-G ADN. **MINCLE**: macrophage-inducible C-type lectin, **SAP-130**: Spliceosome-Associated Protein 130, factor soluble liberado por células necróticas, **DC-SIGN**: Dendritic Cells, specific ICAM-3 grabbing non-integrin. **ICAM**: Intercellular adhesion molecular. **MMR**: macrophage mannose receptor. **HMGB1**: High Movility Group Proteins Box-1. **S 100 A8 y S 100 A9**: calgranulin A y calgranulin B son proteínas unidoras del calcio expresadas en células de origen mieloide, vertidas son señales de daño, **SAA**: Serum Amyloid A. **RLRs**: Retinoic acid-inducible gene 1(RIG-1)-Like Receptors. **CARD**: caspase recruitment domain, **DAI**: DNA-dependent activator of interferon regulatory factors. **MDA- 5**: Melanoma Differentiation-Associated gen-5. **NLRs**: Nucleotide- Binding Domain (**NOD**) and Leucine-rich repeat containing receptors. **MDP**: Muramildipeptide, **ROS**: reactive oxygen species, **IPAF**: Ice Protease-activator factors. **Nota**: Se conservaron las siglas en inglés, por ser la nomenclatura más conocida internacionalmente.

MANIPULACION DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE MOLECULAS PURAS O ESTRUCTURAS DEFINIDAS: ADYUVANTES MOLECULARES.

Como se explicó anteriormente, ha surgido la base del conocimiento que permite “diseñar” o “aprovechar” moléculas relativamente sencillas, pero que son capaces de reaccionar al unirse a los TLRs y/u otros PRRs y desencadenar su activación como lo haría un PAMP de un microorganismo, o un DAMP o señal interna de daño, iniciándose así la era de los adyuvantes moleculares, por lo que se puede plantear que cada adyuvante tiene sus vías de acción molecular o como dicen algunos autores sus huellas moleculares (22).

El compuesto sintético Imiquimod (R-839) cuya naturaleza es una imidazol-quinolina sintética, es capaz de unirse al TLR7 y otro compuesto bastante similar con solo muy pequeñas diferencias el Resiquimod (R-848), interactúan con TLR7 y el TLR8. Ahonen, investigador del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Dartmouth Medical School del Líbano, y sus colaboradores (35) demostraron que el Resiquimod es capaz de inducir IL-12 e IFN α que causan la maduración de células dendríticas (CDs) derivadas de monocitos. La maduración de dichas CDs se comprobó al establecer el incremento de los marcadores de este tipo en células que se correlacionan con la maduración: expresión en la superficie celular de CD83 y el incremento de CD80, CD86, CD40 y moléculas del sistema de Histocompatibilidad como el HLA- DR. Se demostró que esta molécula (Imiquimod), desencadenaba la inducción de la secreción de citoquinas y quimoquinas propias de CDs. Igualmente se probó que esta sustancia era capaz de incrementar las funciones de los CDs como presentadora de antígenos, al incrementar la proliferación de células T, así como las citoquinas derivadas de linfocitos T tanto en esquemas alogénicos como autólogos.

Investigadores del Emory Vaccine Center de Atlanta, Georgia, liderados por Agrawal, (36) demostraron que agonistas del TLR, tales como el LPS de *E. coli* y la flagelina, el primero del TLR4 y el segundo del TLR5, son capaces de estimular respuestas de tipo Th1, mientras que el adyuvante sintético Pam3Cys agonista del (TLR2/TLR1) es capaz de inducir en las CDs un patrón Th2 al igual que el Antígeno del Huevo de *Schistosoma* (SEA, siglas en inglés), esto explica uno de los efectos de este parásito sobre el sistema inmune. En una disertación sobre estudios moleculares de la transmisión de señales intracelulares, quedó evidenciado que la diferencia de activación vía TLR4 en lugar de la vía TLR2, es causada por la modulación de la señal de las quinasas reguladas extracelularmente, al inhibirse la actividad c-Fos y la respuesta de citoquinas en las células dendríticas. Lograron evidenciar cómo al inhibir la síntesis de c-Fos usando un RNA de interferencia (iRNA), se logró eliminar el efecto inhibitorio de c-Fos sobre IL-12p70; la eliminación del potente efecto Th2 de este antígeno del huevo de *Shistosoma* y que se indujera un patrón de citoquinas Th1. Una elegante demostración de un mecanismo molecular de adyuvanticidad y de modulación de la respuesta inmune, que empleamos como ejemplo didáctico de mecanismo de acción molecular de un adyuvante.

INDUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMOQUINAS INMUNOMODULADORAS, POR LOS ADYUVANTES.

Como resultado del reconocimiento, unión y activación de los PRRs a los PAMPs contenidos en los adyuvantes se producen citoquinas y quimoquinas que forman parte de los mecanismos efectores de la inmunidad innata y subsecuentemente estimulan la rama de la respuesta inmune específica correspondiente en dependencia del patrón inicial secretado. Las quimoquinas atraen las células fagocíticas y otras células del sistema inmune al sitio “del combate” con el agente infeccioso si es una infección o del sitio de inoculación si se trata de una vacuna. Los adyuvantes basados en PAMPs pueden inducir la producción de variadas citoquinas y quimoquinas las cuales actúan directa o indirectamente sobre los subpoblaciones de linfocitos T helper y éstos modulan la respuesta inmune adquirida. Las subpoblaciones de Linfocitos T helper, han sido definidos por el patrón de citoquinas que producen de tal manera que la subpoblación T helper 1 (Th-1), produce INF γ , IL-2, IL-12, TNF α , la subpoblación T helper 2 (Th2), produce IL-4, IL-5, IL-13, IL-10. Este clásico paradigma Th1 versus Th2 surgió y ha evolucionado constantemente aumentando los conocimientos; el mérito principal de este paradigma, en lo referente a vacunas, ha sido haber proporcionado una guía para clasificar y evaluar a los candidatos adyuvantes en base al patrón de citoquinas secretado. (37). Este paradigma Th1/Th2 no solamente permite una mejor comprensión de los mecanismos envueltos en la protección, sino también en la patogénesis de muchos desórdenes inmunopatológicos, asimismo nos provee de una base para el desarrollo de nuevos tipos de vacunas contra agentes infecciosos y de nuevas estrategias para la terapia de la alergia, las enfermedades autoinmunes y el cáncer. En los últimos años se han descubierto nuevas subpoblaciones de linfocitos, (CD4⁺ CD25⁺, Tr1, Th3 y Th17, Th22, Th9, Tfh (T helper foliculares), iTreg (T reguladores inducibles) (38-44), que están implicadas en la regulación de diversas respuestas inmunes normales y patológicas lo cual viene a hacer más complejo el paradigma inicial pero también hace más integral y comprensible el panorama de la inmunomodulación y se convierte en un concepto de insustituible utilidad para los que trabajamos en el campo de los adyuvantes y las vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Las subpoblaciones de células Th3 (linfocitos T auxiliares 3) y Tr1 (linfocitos T reguladores 1), tiene una función crítica en el control de la tolerancia oral, y a nivel del Tejido Linfoide Asociado a Intestino (GALT, siglas en ingles), están reguladas por IL-10 y TGF β e intervienen en los niveles de secreción de IgAs. La caracterización de un nuevo subtipo de T colaborador, el linfocito Th17, ha traído más complicación al modelo básico Th1/Th2. Estas células productoras de IL-17 fueron descritas inicialmente como una población implicada solo en la autoinmunidad, pero ahora se cree que tienen sus propias funciones efectoras y reguladoras más abarcadoras, (45).

La capacidad de inducir y mantener un patrón Th1 de respuesta inmune ha sido un propósito de los vacunólogos que trabajamos en pos de obtener vacunas profilácticas anti infecciosas (46,47), vacunas anti alérgicas y otras vacunas terapéuticas (48,49). En el modelo de ratón los adyuvantes que estimulan un patrón de respuesta Th1, se evidencia por la reacción de hipersensibilidad (DTH, siglas en inglés) y por la producción relativamente incrementada de la subclase IgG2a de anticuerpos, y por su patrón de citoquinas predominante, medido a nivel de mRNA inducido o directamente midiendo las citoquinas. Los adyuvantes tales como la toxina colérica (CT) y las sales de aluminio inducen preferentemente, una respuesta tipo Th2, aumentando la producción de IgA o IgE, en dependencia de

la vía de inmunización. La respuesta de anticuerpos IgE está asociada también con una respuesta Th2 por efecto de los alérgenos.

EFFECTOS DE LOS ADYUVANTES SOBRE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS.

Los vacunólogos dedicados a la investigación de los adyuvantes estudian el efecto de estos sobre las células presentadoras de antígenos. (CPA).

Las células dendríticas (CDs), son las principales células presentadoras de antígenos para realizar el “*priming*” o primer estímulo, de inicio de la respuesta inmune y son las únicas (CPA) que pueden presentar antígenos a las células T vírgenes, lo que las convierte en el nexo celular esencial entre el sistema de la respuesta inmune innata y el sistema de la respuesta inmune adquirida (48).

Los adyuvantes inmunológicos pueden aumentar la captación, procesamiento y presentación de antígenos por varios tipos de CDs. Tanto los adyuvantes basados en sales minerales, como los formados por emulsiones y también los elaborados con productos microbianos actúan a través de subconjuntos de CDs (50,52,53). Dupuis y colaboradores demostraron que el antígeno gD2 del virus del Herpes Simple tipo 2 marcado con fluoresceína y formulado en mezcla con el MD59, un adyuvante en forma de emulsión, fue internalizado por las células dendríticas, después de la inoculación intramuscular en ratones (51).

La maduración de las células dendríticas portando el antígeno se requiere para la presentación óptima de este y la inducción de respuesta inmune, estimulando a las células T (54). Los adyuvantes que inducen la maduración de las células dendríticas aumentan la respuesta inmune a través de la activación de células T. Las CD inmaduras en el sitio de la inoculación, captan el antígeno mediante fagocitosis y a la vez son estimuladas a madurar por el contacto con los PAMPs contenidos en los adyuvantes. De forma secuencial, las células dendríticas maduras trafican hacia los ganglios linfáticos regionales donde inician la respuesta inmune adaptativa, al activar y presentar el antígeno a los linfocitos T vírgenes, residentes en esas estructuras.

Adyuvantes particulados como las microesferas de PLGA (Ácidos Poliláctico y Poliglicólico (55), los ISCOMS (Complejos Inmunoestimulantes) (56) y ciertas toxinas bacterianas como las de BP-Adenilato ciclasa promueven la entrega de antígenos exógenos a las células dendríticas y la presentación a través del MHC Clase I resultando en la inducción de respuestas específicas de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Análogo a las células dendríticas, se ha demostrado que los macrófagos captan antígenos particulados contenidos en las formulaciones de micro-esferas sintéticas con antígenos conjugados a su superficie, o liposomas conteniendo antígenos encapsulados y lípido A. Después de la fagocitosis, el antígeno es liberado en el citoplasma, donde es procesado como si fuera un antígeno producido intracelularmente, durante la replicación viral o por bacterias intracelulares. Entonces el antígeno es procesado por el macrófago a través de las moléculas del MHC Clase I y se induce una respuesta CTL (57,58).

La ingestión de lípido A en liposomas por los macrófagos, también puede aumentar la presentación a través del MHC Clase II de antígenos encapsulados en liposomas. Rimaniol y colaboradores (59) mostraron *in vitro*, que macrófagos aislados y estimulados con el adyuvante hidróxido de aluminio, contenían inclusiones cristalinas intracelulares de $Al(OH)_3$. Los macrófagos que contienen el $Al(OH)_3$ intracelular muestran modificaciones fenotípicas y funcionales incluyendo la expresión de marcadores de células dendríticas de origen mieloide. HLA-DR(Alto) / CD86 (Alto), CD83+, CD1a-, CD14-, e inducen respuesta de memoria específica, restringida por el MHC-II. Sin embargo esas células retienen su morfología de macrófagos, esto ubica a dichas células, en la posición de jugar un papel en el mecanismo de acción del adyuvante hidróxido de aluminio y otras sales del mismo.

EFFECTOS DE LOS ADYUVANTES SOBRE REPARTO /ENTREGA DE ANTÍGENOS.

Algunos adyuvantes que no ejercen su acción a través de los PAMPs por ejemplo, las emulsiones y los que contienen sales como las de aluminio, funcionan a través del reparto y entrega o presentación de los antígenos y se clasifican como sistemas de liberación de antígenos (60). El efecto originalmente atribuido a las sustancias adyuvantes, fue el llamado “efecto de depósito” mediante el cual este tipo de adyuvantes aumentaban el tiempo de permanencia de los antígenos, cercano al punto de inoculación. Aunque este solo mecanismo puede contribuir, es en extremo simplista y se ha refinado al incluirse el aumento de la entrega a las CDs, otras CPAs y hacia los órganos linfoides secundarios. La inmunogenicidad de péptidos sintéticos y otros antígenos solubles, que de otra manera serían rápidamente eliminados o aclarados del sitio de la inyección, sin una eficiente entrega a los ganglios linfáticos cercanos al sitio de inoculación, puede ser mejorado usando las sales de aluminio y los adyuvantes basados en emulsiones.

AVANCES Y SITUACION ACTUAL EN CUBA EN EL CAMPO DE LOS ADYUVANTES PARA VACUNAS HUMANAS.

La plataforma tecnológica de adyuvantes para vacunas humanas más extendida y aplicada hasta el momento en Cuba, se basa en la tecnología proteoliposómica propiedad del Instituto “Finlay”, patentada a partir de 1987 en más de 20 países y organizaciones (61-63) donde se reivindica el método inicial de obtención de los proteoliposomas (PLs), a partir de la cepa CU-385/83 de *N. meningitidis* B y su aplicación para producir una vacuna antimeningocócica (64). El ensayo clínico de Fase III, con 106 252 voluntarios de 10-16 años de edad, en siete provincias del país y los resultados de las primeras campañas masivas de inmunización, se demuestra e informa a la comunidad científica por primera vez que esa conformación proteoliposómica, estable por sí misma pero adsorbida además en hidróxido de aluminio fue capaz de funcionar diferente a otros intentos anteriores y otros casi simultáneos, pero cuya diferencia principal estribaba precisamente en la extracción exitosa de las proteínas de membrana externa para formar proteoliposomas o Vesículas de Membrana Externa (VME) artificiales muy distintas cualitativamente de las formadas espontáneamente durante el cultivo del

germen. Es un adyuvante obtenido industrialmente bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción (BPP).

Estudios posteriores han demostrado que el patrón dominante de citoquinas Th1, y varias de las propiedades de la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC[®], dependen de ese segundo adyuvante en forma de proteoliposoma (PLs) (65) y que es posible obtener formulaciones derivadas directamente del mismo, mediante su transformación empleando Ca⁺⁺ en la AFCo1, nombre del cocleato obtenido al colapsar y enrollarse sobre sí mismo la pseudomembrana del PLs, mediante la unión con el ión Ca⁺⁺. Este adyuvante tiene propiedades inmunizantes directas como candidato vacunal nasal contra *N. meningitidis* (66) y al igual que el PLs que lo origina se ha empleado para formular candidatos vacunales contra la alergia (67). Los cocleatos derivados directamente del PLs de *N. meningitidis* B, al contener prácticamente todo el conjunto inalterado de PAMPs, que posee la vacuna VA-MENGOC-BC[®], son especialmente adecuados para la inmunización nasal, aunque se han empleado también por otras vías de inmunización (68) y conservan la propiedad de inducir un patrón de citoquinas Th1, incluso después incorporar un complejo proteico, formado por las proteínas de superficie 4 y 5 del merozoito de *Plasmodium falciparum* al AFCo1; la inmunización con esta formulación experimental para ratón, resultó en la inducción aumentada de anticuerpos IgG1 e IgG2a, incremento significativo de la producción de IFN gamma, y una fuerte respuesta DTH, lo que ubica a este adyuvante en la cartera de disponibilidad para el desarrollo de una vacuna contra la malaria (69) de más potencialidades de éxito. Todos estos estudios aplicados al AFCo1 del Instituto "Finlay" han ido permitiendo acumular evidencias de que usando estos sistemas de entrega y adyuvación por vía mucosal se puede inducir respuesta tanto mucosal como sistémica (68,68a). Investigadores de éste mismo Instituto evidenciaron que el PLs aplicado nasalmente, es capaz de actuar como un buen presentador de antígenos por esta vía y logra inducir una respuesta de anticuerpos IgA específica en la mucosa nasal y también anticuerpos específicos IgG sistémicos, lo cual los hace adecuados para formulaciones nasales (66). Igualmente, ha quedado evidenciado que tanto el PLs como el Cocleato son capaces de estimular, después de la inmunización nasal y oral una respuesta funcional de anticuerpos.

Se demostró que la vía intranasal es superior como sitio inductor al lograr respuesta más elevada a distancia, consistente en IgA, en la vagina y en saliva; además de anticuerpos IgG e IgG2a en el suero. La re-estimulación tanto con PLS como con Cocleato induce producción de IFN gamma y no IL-5 (68). Muy prometedores candidatos vacunales contra el Virus del Herpes Simple (HSV) genital se formularon empleando AFCo1 como adyuvante, la eficacia protectora demostrada mediante el reto virulento, en el modelo pre-clínico del ratón fue muy elevada y consistente (70). Los últimos resultados confirman que se perfila como un buen adyuvante en general para Enfermedades de Transmisión Sexual, (71).

La Cátedra de Inmunología y Biotecnología del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana (IFAL-UH), fue realmente la entidad pionera introduciendo en Cuba la tecnología de obtención de cocleatos, con el método de Susan Gould-Fogerite, modificado por Tamargo B. y colaboradores,(91) para el desarrollo de adyuvantes nanoparticulados, para muchos de estos han empleado los proteoliposomas (PLs) de *N. meningitidis* del Instituto "Finlay" como material de partida, pero difiere en la tecnología, pues han desarrollado nanoproteoliposomas (nPLs) y nanococleatos (nChs) de estructura molecular definida. Estudios toxicológicos y pre-clínicos de inmunogenicidad, seguridad y

eficacia de formulaciones de un nuevo candidato a vacuna antimeningocócica, con estos adyuvantes y sin hidróxido de aluminio y más definida estructuralmente que la de PLs originales concluyeron con resultados positivos (72,73).

Estos nPLs y nChs se han evaluado exitosamente en el modelo animal para otras aplicaciones de tipo terapéuticas como el manejo de la Reacción del Injerto contra el Huésped (GVH, siglas en inglés) (49). Se ha demostrado la capacidad de inducir el patrón de citoquinas Th1, necesario para lograr la respuesta protectora y de comprobada funcionalidad de los anticuerpos, la potente inducción de DTH y respuesta celular con una buena memoria inmunológica, también han sido realizados extensivos estudios de seguridad y toxicología y se ha obtenido un excelente perfil de seguridad para estas formulaciones.

La tecnología proteoliposómica ha sido extendida a otros patógenos y una nueva serie de candidatos vacunales basada en PLs y Cocleatos están en ensayos en el Instituto "Finlay", contra el cólera, empleando una variante de cocleato derivada del PLs obtenida de la superficie bacteriana de *Vibrio cholerae*, llamado AFCo2, habiéndose comprobado que estas microestructuras son capaces de inducir mediante inmunización por vía nasal una respuesta inmune sistémica y mucosal. Antígenos esenciales de *V. cholerae*, quedaron formando parte del AFCo2 y se comprobó la producción de IgA funcional en saliva e intestino, indicando un buen potencial para este preparado (74).

Una aplicación similar de la tecnología proteoliposómica se ha realizado recientemente para obtener una vacuna acelular de nueva generación contra *Leptospira interrogans*, en los estudios de inmunidad, seguridad y eficacia evaluados mediante reto, en el modelo animal de Hámster Sirio Dorado frente a 100 000 DL-50 la protección fue del 100% y el estado de portador eliminado de manera total. Una de las formulaciones evaluadas, neo-cocleares que también protegió al 100% de los animales inmunizados contenía solo PAMPs definidos de *Leptospira interrogans* (75).

Otra serie de aplicaciones de la tecnología vesicular patentada por el Instituto "Finlay" con algunas innovaciones ha sido realizada para una nueva generación de vacunas contra *Shigella*, *E. Coli* y *Salmonella* y para obtener una vacuna acelular contra *Bordetella pertussis* (76); resultados esperanzadores han sido obtenidos en modelos animales con dichas formulaciones en vacunas experimentales.

Como resultado de la colaboración entre la Universidad de la Habana, el Centro de Biopreparados y el Centro de Inmunología Molecular, se logró obtener formulaciones liposomales adyuvantes de antígenos poco inmunogénicos de interés en la inmunoterapia del cáncer y de la alergia por ácaros (83)

Una colaboración entre el Instituto "Finlay" y el Centro de Inmunología Molecular (CIM), en la década de los 90, del siglo pasado para resolver la pobre inmunogenicidad de los gangliósidos tumorales, como antígenos para vacunas anticáncer experimentales, resultó en la incorporación de los mismos al PLs, mediante un proceso de re-ensamblaje, lo cual arrojó como resultado, no solo la solución de esa pobre inmunogenicidad sino un efecto de más alcance, al desarrollarse una nueva formulación adyuvante denominada Proteoliposomas de muy pequeño tamaño (VSSP, siglas en inglés),(77); el cual ha venido empleándose con éxito creciente en el desarrollo de vacunas anticáncer actualmente en diferentes fases de desarrollo (78,78a,79). Se trata de un nuevo adyuvante cuya tecnología es propiedad cubana, producido industrialmente bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción y prometedor en el campo de las vacunas terapéuticas.

En la Figura 2 se resume de manera ilustrativa, empleando fotografías desarrolladas con diferentes tipos de técnicas de microscopía electrónica, parte de estas estrategias.

Una amplia gama de adyuvantes cubanos tales como cocleatos, proteoliposomas, el CliptoxTM [familia de adyuvantes derivados de una zeolita cubana] (80-82) y otros comerciales, han sido evaluados en pre-clínica y en estudios inmunotoxicológicos en el Centro TOXIMED de Santiago de Cuba. También se ha trabajado en la utilización de numerosos productos naturales provenientes de plantas medicinales y de recursos marinos como las algas. Una vertiente de gran interés en inmunoterapia y en esquemas para producir antisueros específicos, es el desarrollo de la investigación de formulaciones inmunizantes en medio CM95-Magnetizadas, lo cual ha dado un sorprendente aumento de la potencia y calidad de la respuesta inmune, unida a su probada inocuidad (84-86). Siendo potenciadas las respuestas tanto de anticuerpos como de células, al parecer a expensas de una estimulación múltiple de varios tipos de células de la respuesta inmune innata.

El colectivo de vacunas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), tiene importantes resultados pre-clínicos y clínicos, empleando Partículas Similares a Virus (VLPs, siglas en inglés), como plataforma original de adyuvantes vacunales. Han sido capaces de obtener en varios modelos animales (ratón, ratas, primates) y en el humano, respuestas específicas de células T útiles en el desarrollo de vacunas terapéuticas. La respuesta obtenida presenta un patrón de citoquinas Th1 dominante y se potencia tanto la respuesta inmune humoral como celular contra numerosos antígenos virales y de cáncer. Las formulaciones vacunales novedosas conteniendo VLPs han sido administradas por vía intranasal o sistémicas, por ambas vías se lograron respuestas funcionalmente efectivas contra HBV (virus de hepatitis B), HCV (virus de la hepatitis C) y virus del dengue, así como también contra antígenos de interés en cáncer de próstata y del cérvix. (87), e igualmente en las formulaciones de péptidos sintéticos multiantigénicos contra HIV-1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1) (88), donde además del patrón Th1 con secreción de IFN gamma, se incrementó la respuesta TCD8⁺ (CTL), con buena respuesta sistémica y mucosal.

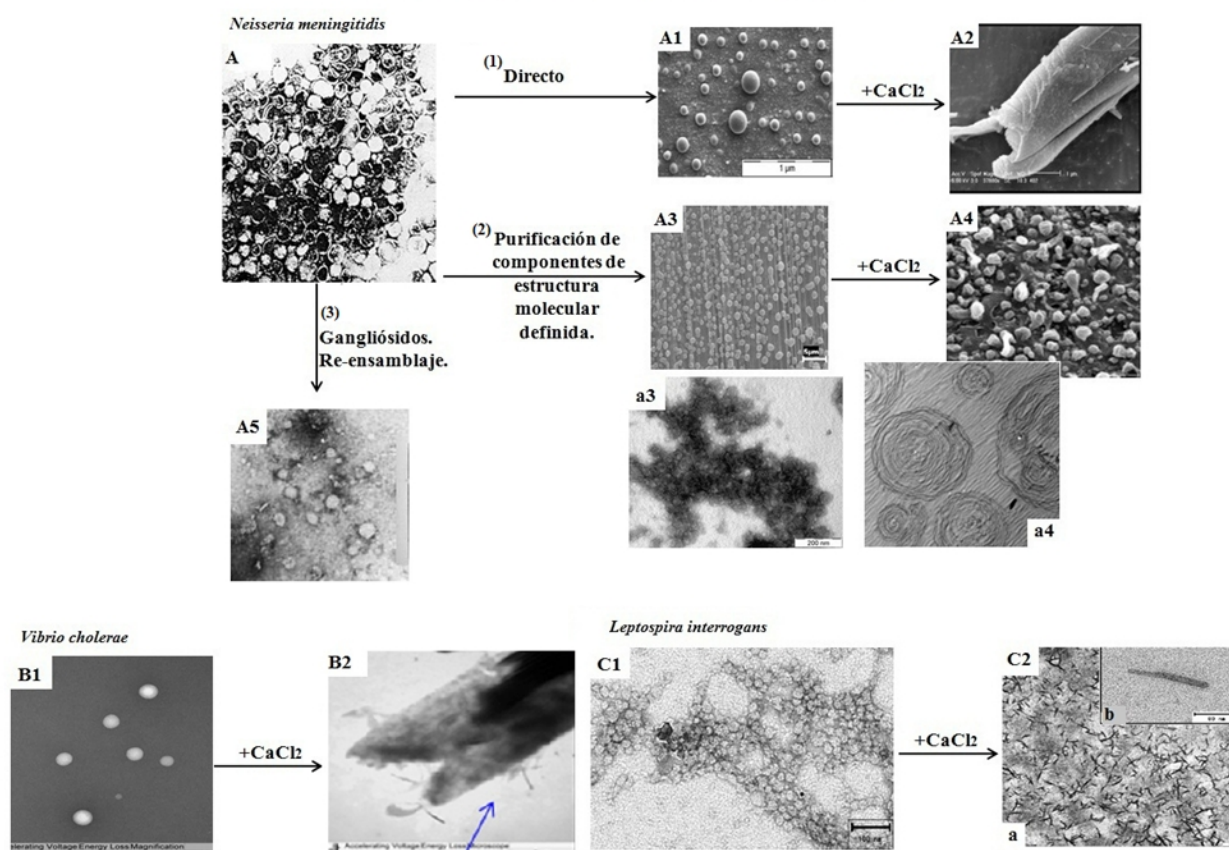


Figura 2: Imagen que representa, por medio de microfotografías electrónicas, la plataforma de formulaciones adyuvantes, de estructura proteoliposómica y coclear, desplegada a partir de la tecnología propietaria, desarrollada por el Instituto “Finlay” de Cuba, para la obtención de vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* serogroup B. Utilizando este mismo procedimiento, modificaciones del mismo y/o empleando otros microorganismos se han diseñado diversos sistemas de liberación de antígenos vacunales como adyuvantes para ser empleados por vía sistémica y mucosal.

A: MET, mostrando una microfotografía de las VME de *N. meningitidis* B, estas VME o PLs (**A1**) se emplean directamente como adyuvantes (1), por adición de CaCl_2 , los PLs de **A1** se transforman en cocleatos **A2**, (**A1** y **A2**): MEB, donde se aprecian PLs y cocleatos (Ch) respectivamente. A partir de **A** se purifican componentes de estructura molecular definida (2), los cuales se ensamblan y formulan en neo-proteoliposomas (nPLs) (**A3**); adicionando CaCl_2 los nPLs, se modifican y forman neo-cocleatos (nCh) (**A4**). **A3** y **a3** se corresponden con las imágenes por MEB y MET de los nPLs. **A4**, MEB de los nCh, se aprecia en **a4** una microfotografía obtenida por MET y fractura, se observa una vista de un corte transversal de partículas cocleares, donde se distinguen las múltiples capas concéntricas que forman estas estructuras. La adición de gangliósidos a las VME de **A** combinado con el uso de tecnologías (3) da lugar a la formación de proteoliposomas de muy pequeño tamaño conocidos como VSSP, empleados como adyuvantes en vacunas terapéuticas contra el cáncer **A5** muestra las imágenes por MET de los VSSP. Después de extraer las proteínas de membrana de *Vibrio cholerae* (**B1**) y *Leptospira interrogans* (**C1**) se forman vesículas de membrana o PLs, imágenes captadas por MET. **B2** y **C2** muestran la formación de los cocleatos equivalentes, **B2** mediante MET con congelación y fractura y **C2** por MET, en **C2a** se nota la presencia de múltiples cocleatos con un largo aproximado entre 100 y 150 nm y entre 15 y 30 nm de diámetro, en **C2b** se observa la imagen aumentada de una partícula de estructura coclear, magnificación 60K. **MET:** Microscopía Electrónica de Transmisión, **MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido. Basado en las referencias 61-65,66,72-75,77-78a.

Prometedores e interesantes resultados han sido obtenidos en primates no humanos inmunizados con un preparado vacunal experimental, basado en la proteína híbrida P64K-Dominio III de la envoltura del Virus Dengue-2, adyuvadas con PLs o Polisacárido A (PSC-A) de *N. meningitidis*. La respuesta inmune a la formulación empleando PSC-A fue superior, ya que esta fue la única capaz de conferir protección frente al reto viral, dando el primer reporte mundial del polisacárido A de *N. meningitidis* como un potencial adyuvante vacunal. Se ha propuesto como posible mecanismo de acción, la ayuda en la presentación antigénica del antígeno viral vía Receptor de Manosa (RM) en las células dendríticas. (89). Estudios con el mismo antígeno del Virus Dengue-2, pero usando el adyuvante sintético IC 31 en el modelo de ratón sitúan también, a esta formulación adyuvante, como una posible opción para continuar el desarrollo hacia una vacuna pues se obtuvo una respuesta adecuada de anticuerpos IgG1 e IgG2a y una buena producción de IFN γ en esplenocitos estimulados "*in vitro*" con el antígeno viral, así como protección total frente al reto virulento, no correlacionada con la inducción de anticuerpos neutralizantes, lo contrario sucedió con el grupo inmunizado con la formulación adyuvada con aluminio. Lo cual reafirma el papel crucial de la inmunidad celular y del patrón de citoquinas Th1 en este modelo de reto viral causante de encefalitis (90).

CLASIFICACIÓN DE LOS ADYUVANTES

Para poder resumir en el espacio limitado que este tipo de trabajo impone, hemos diseñado la Tabla II que compila, ordena y clasifica los adyuvantes desarrollados y usados globalmente y en Cuba, según su naturaleza y origen, reúne además su empleo en vacunas, así como su mecanismo de acción y las principales referencias bibliográficas para los interesados en profundizar en estos aspectos.

Tabla II: Clasificación de los adyuvantes

Tipo de adyuvantes	Ejemplos principales genéricos	Adyuvantes de Marcas Registradas	Extensión/ Licencia	Diana/mecanismo	Ref.
Sales minerales.	Hidróxido de Aluminio. Fosfato de Aluminio. Fosfato de Calcio.	Alhydrogel® Rehydrogel® Adjuphos® Rehydraphos® Calcium Phosphate Adjuvant®	Amplio uso. Empleado mundialmente en múltiples vacunas.	NLRP3. CPA. Reparto de Antígenos.	92,93, 94,95.
Emulsiones aceite-agua.	Adyuvante Incompleto de Freund. Emulsiones biocompatibles.	Montanide ISA-51® MF59® SAF® Montanide ISA-720®	Vacuna Fluad®: Influenza	Reparto de Antígenos. CPA.	96,97, 98,99.
Sustancias tensoactivas, desestabilizantes de membranas	Saponinas.	QS21®	Parte de serie ASB-0	Membrana de la CPA. Múltiples mecanismos.	100
Adyuvantes particulados	Proteoliposomas. Cocleatos Microparticuladas y polímeros biodegradables Complejos Inmunoestimulantes. (ISCOMS). Liposomas. Virosomas. (Partículas similares a virus).	AFPLs®-1.VSSP®. AFCo-1®. PLG (partículas Poly Láctico-Poly Glicólico) ISCOMATRIX® VLPs-CIGB®	VAMENGOC-BC® Amplio uso en Cuba y América Latina, primera vacuna proteoliposómica registrada. CIGB-230 Vacuna- HepC. NASVAC. HepB terapéutica. VSSP® Cáncer Próstata /HPV.	Múltiples mecanismos. Reparto de los antígenos. CPA.	62,63,64,66, 72,76,101, 102, 103, 104, 87,79
Adyuvantes de origen microbiano	Muramil dipéptido. MDP (análogos y derivados). Toxinas bacterianas Endotoxinas y derivados ADN bacterianos. Flagelina Lipopéptido de micoplasma Poli-sacáridos bacterianos Polisacárido Meningo A- Dengue.	Murabutide. Treonil-MDP. MDP. Toxina de Cólera (CT). Toxina de E.Coli (LT). Monofosforil lípido A(MPL®). LPS diferente origen/ Toxicidad disminuida. CpG oligonucleótidos. Componentes de Flagelina (FLjB). MALP-2 (Lipopéptido Activador de Macrófagos)	NO Registrada pero sí evaluada. NO Registrada pero sí evaluada. SI. Vacunas registradas. SI. Vacunas registradas. NO Registrada pero sí evaluada. NO Registrada pero sí evaluada. NO Registrada pero sí evaluada. NO Registrada pero sí evaluada. NO Registrada. Evaluada en monos.	NOD32 TLR4 TLR4 TLR9 TLR5 CPA MR de CPA.	105,106,107 108,109,110, 111,112,113, 114,115,89

Adyuvantes sintéticos	Bloques de copolímeros(No iónicos) Polifosfazeno. Compuestos Semi-sintéticos base LPS. Imidazoquinolona similares. Polinucleótidos sintéticos	L121 PCPP R-C529 E 5564 Imiquimod, Resiquimod, Gardiquimod Poli A:U , Poli I:C		TLR7 TLR7/8 Maduración CDs TLR7/8	116,117,118, 119,120.
Citoquinas como adyuvantes.	IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN γ			Citoquinas	121,122, 123,124.
Adyuvantes Genéticos (DNA inmunización).	Citoquinas, moléculas co-estimuladoras, quimeras. Sustancias regulatorias diversas clonadas y conforma-das en plásmidos.	DNAP-IL-12 DNAP-IL-2 DNAP-IFN γ DNAP-CD 4OL		Citoquinas	125,126.
Otros de origen natural.	Derivados de la Inulina. Poli-sacáridos derivados de algas marinas. Acemanano Quitina/Quitosana.		NO aprobados aun, pero sí evaluados en humanos.	Macró-fagos/fagocitosis.	127.
Adyuvantes Combi-nados[I]	AS02 Aceite Escualeno+Saponina QS21+MPL. AS03 Aceite Escualeno Emulsión. AS04 MPL + Hidróxido de Aluminio. AS01 MPL + QS21 (Liposoma).	AS01 a 4 (SKB).	Fendrix® HepatitisB. Papiloma Virus, Cervarix®. Vacuna malaria experimental.	Múltiples mecanismos: Activa CD, Citoquinas y NF κ B	14,15,17,40,4 6,50,59,128, 129,130,131, 132,133,134.
Adyuvantes Combi-nados[II]	IC-31 [KLK (NH2-KLKL5KLK-COOH)]+ (esqueleto fosfodiéster ODN).	IC-31®	NO aprobados aun pero sí evaluados en humanos.	Múltiples mecanismos: Incluyendo TLR9.	90

CLASIFICACIÓN DE LOS ADYUVANTES:

Como se puede apreciar en la Tabla II los adyuvantes inmunológicos son sustancias de muy diversos orígenes y naturaleza que cumplen con las condiciones para ser considerados adyuvantes para vacunas humanas o candidatos en evaluación para convertirse en futuros adyuvantes vacunales, fundamentalmente por su inocuidad y potencia inmunoestimulante - direccionadora hacia una respuesta protectogénica deseada. Algunos son diseñados y sintetizados obedeciendo a una estrategia racional para potenciar y/o direccionar la respuesta inmune, otros son de ese mismo origen y solo la casualidad o la observación inteligente han podido demostrar sus propiedades adyuvantes de la respuesta inmune. Algunos provienen de extractos vegetales, animales, bacterianos o de levaduras.

La clasificación puede realizarse según el origen natural o sintético, en base a las propiedades físicas y químicas de las sustancias en cuestión, o a su naturaleza particulada o soluble y también basándonos en el mecanismo de acción fundamental que explica la actividad adyuvante. Asimismo suelen clasificarse según su empleo por rutas de inmunización mucosales o sistémicas y por las sub-rutas comprendidas. Lo cierto es que todas estas clasificaciones se emplean según los fines que se persigan y todos tienen sus fortalezas o debilidades, igualmente sucede que muchos adyuvantes y candidatos a adyuvantes pueden ocupar más de un acápite en cualquiera de las clasificaciones. Como puede observarse en esta Tabla II solo los adyuvantes basados en sales de aluminio, el MF59, que es una emulsión de aceite en agua, el ASO3 también una emulsión, y el ASO4, que comprende una mezcla de hidróxido de aluminio y MPL, son adyuvantes comprendidos en vacunas de expansión comercial mundial. Otros adyuvantes como los Proteoliposomas están comprendidos en vacunas que produce y comercializa Cuba como VA-MEMGOC- BC®, los ISCOMS, Liposomas, VLPs, están introducidos en parte del mercado o iniciando su introducción comercial, o muy adelantados en su desarrollo clínico, otros son solo experimentales.

MECANISMOS DE ACCION: Como se aprecia en la Tabla II, actuando sobre: Reparto de los antígenos, sobre la CPAs, sobre las membranas de las células dendríticas, sobre los PRRs, como los TLRs, NLRs, NOD "Like receptors", como el NLRP3, NOD32, sobre las citoquinas, sobre factores de transcripción como el NFκβ, sobre la captación/procesamiento de Ags, como la fagocitosis, sobre macrófagos, sobre Receptores de Lectinas tipo C, como el receptor de manosa, (RM), o sobre múltiples mecanismos simultáneamente.

ASPECTOS REGULATORIOS

Paralelamente al esfuerzo por la aplicación de los nuevos conocimientos básicos aquí discutidos, al desarrollo de adyuvantes para nuevas vacunas, que cumplan con las características enunciadas en las definiciones que brindamos en la introducción, una atención priorizada debe prestarse a los aspectos regulatorios, para la evaluación de las formulaciones vacunales con los nuevos adyuvantes, durante los estudios toxicológicos y pre clínicos e igualmente en los ensayos clínicos, que condicionan el registro de las vacunas de nueva generación. Las principales agencias regulatorias internacionales y algunos países han emitido documentos que deben tenerse en cuenta desde el mismo momento del trabajo de mesa inicial, para diseñar una nueva formulación adyuvante (12,13, 137-143).

CONCLUSIONES

Después de más de 80 años de estancamiento en el uso casi exclusivo de adyuvantes derivados de sales del aluminio, para vacunas humanas y de la prevalencia del empirismo fundamentalmente, como método de trabajo para obtener formulaciones vacunales “adyuvadas”; se han introducido algunos nuevos adyuvantes con diseño más racional pero aún son muy pocos los que han pasado la barrera del Registro Médico, las exigencias regulatorias han aumentado, así como el camino de la demostración de eficacia y seguridad de las formulaciones conteniendo nuevos adyuvantes, los estudios preclínicos, toxicológicos y clínicos son prolongados, caros y exigentes.

Más recientemente se ha iniciado una revolución en este campo, al tenerse nuevos conocimientos para entender las bases de la adyuvanticidad, las cuales radican en la posibilidad de manipular y modular la relación que existe entre la inmunidad innata y la adquirida de manera racional, mediante ligandos moleculares o sustancias que los portan, y que pueden activar receptores y vías de la respuesta innata, que a su vez activan de manera eficiente componentes y efectores deseados de la inmunidad adquirida, con un amplio y eficiente repertorio. Una verdadera avalancha de nuevos adyuvantes más definidos, incluso moleculares están en acelerado desarrollo mundialmente sobre todo en manos de las grandes compañías farmacéuticas, en ese entorno Cuba puede exhibir significativos resultados con novedosas formulaciones adyuvantes, algunas de ellas incluso patentadas, y muy avanzadas en su desarrollo tecnológico y clínico.

Referencias

- (1) Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. The achievement of the Global Eradication of Smallpox. Geneva. World Health Organization; 1979.
- (2) Plowright W. The duration of immunity in cattle following inoculation of rinderpest cell culture vaccine. J Hyg ; 1984.
- (3) Normile D. Animal Science. Rinderpest, deadly for cattle, joins smallpox as a vanquished disease. Science 2010; 330- 435.
- (4) Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H. Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virology*. 2010; 7: 52. [doi:10.1186/1743-422X-7-52](https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-52). [PMC 2838858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2838858/). [PMID 20202190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20202190/).
- (5) Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l' antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. Bull Soc Centr Med Vet 1925; 101:227-234.
- (6) Ramon G. Procèdes pour accroître la production des antitoxines. Ann Inst Pasteur (Paris) 1926; 40:1-10.
- (7) Glenn A, Pope C, Waddington H, Wallace U. The antigenic Value of toxoid precipitated by potassium alum. J Pathol Bacteriol 1926; 29:31-40.
- (8) Glenn A, Buttle G, Stevens M. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: Toxoid precipitated with alum. J Pathol Bacteriol 1931; 34:267-275.
- (9) Shirodkar S, Hutchinson RL, Perry DL, et al. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines, Pharm Res 1990; 7:1282-1288.
- (10) Vogel FR, Powel MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients, in Powell MF, Newman MJ, eds. Vaccine Design the subunit and adjuvant approach. New York, Plenum Press; 1995 p. 141-248.
- (11) Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 2007; 25: 3752–3762.
- (12) FDA. Common Ingredients in U.S Licensed Vaccines
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm187810.htm>. July 7, 2011.
- (13) Tomljenovic L, Shaw CA. Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? Current Medicinal Chemistry 2011; 18: 2630-2637.
- (14) Megan KL, MacLeod A, McKee S, Alexandria D, Wang J, Mason R, et al. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. PNAS; May 10, 2011; 108 (19): 7915.
- (15) Pichichero ME. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. Human Vaccines July/August 2008; 4 (4): 262-270.
- (16) Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted. Vaccine 2001; 19:2673-2680.

- (17) Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira MLS, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res*, June 2011; 44(6) 500-513. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500064.
- (18) Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010; doi 10.1155/2010/672395.
- (19) Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311: 1-16.
- (20) Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 240-273.
- (21) Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 2005; 11:S63-S68.
- (22) Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Lavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *PNAS*, July 29, 2008; 105 (30):10501–10506.
- (23) Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006; 124: 815-822.
- (24) Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.
- (25) Rehwinkel J. Exposing viruses: RNA patterns sensed by RIG-I-like receptors. *J Clin Immunol* 2010; 30: 491-495.
- (26) Dam TK, Brewer CF. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* 2010; 20: 270-279.
- (27) Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009; 214: 562-575.
- (28) Figdor CG, Van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 77-84.
- (29) Schlee M, Hartmann G. The chase for the RIG-I ligand - recent advances. *Mol Ther* 2010; 18: 1254-1262.
- (30) Netea MG, Van der Meer JW. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med* 2011; 364:60-70.
- (31) Ebensen T, Guzmán CA. Immune modulators with defined molecular targets: Cornerstone to optimize rational vaccine design. *Human Vaccines*, January/February 2008; 4 (1): 13-22.
- (32) Kaisho T, Akira S. Toll- like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1589: 1-13.
- (33) Takeuchi O, Akira S: Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr Opin Cell Biol* 2007; Apr; 19(2):185-91.
- (34) Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 114-119.

- (35) Ahonen CL, Gibson SJ, Smith RM, et al. Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T- cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cell Immunol* 1999; 197:62-72.
- (36) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal- regulated kinase- mitogen- activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003; 171: 4984- 4989.
- (37) Moingeon P, Haensler J, Lind berg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 2001; 19:4363-4372.
- (38) Puggioni F, Durham SR, Francis JN. Monophosphoril lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favors of Th1 responses. *Allergy* 2005; 60: 678-684.
- (39) Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124:849-863.
- (40) Aimaniananda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 287-295.
- (41) Holz LE, Jakobsen KP, Van Snick J, Cormont F, Sewell WA. Dexamethasone inhibits IL-9 production by human T cells. *Journal of Inflammation* 2005; 2:3. doi: 10.1186/1476-9255-2-3.
- (42) Xie M-H, Aggarwal S, Ho W-H, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (40), October 6: 31335–31339.
- (43) Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology. The Japanese Society for Immunology*, 2011; 23(3): 159–163, doi:10.1093/intimm/dxr001.
- (44) King C, Tangye SG, Mackay CR. T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26:741–66.
- (45) Qian X, Wang K, Wang X, Zheng SG, Lu L. Generation of human regulatory T cells de novo with suppressive function prevent xenogeneic graft versus host disease. *International Immunopharmacology* xxx (2011) xxx–xxx.
- (46) Sharp FA, Ruane D, Class B, Creagh E, Harris J, Malyala P, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *PNAS*, January 20, 2009; 106 (3): 870–875.
- (47) Pérez O, Lastre M, Bracho G, Del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al. Natural *neissera* derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *Pharmacology online* 2006; 3:762-764.
- (48) Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124:849-863.
- (49) Sierra VG, Tamargo B. Capacidad inmunopotenciadora de nuevos adyuvantes vacunales evidenciada en el modelo experimental de la reacción Graft vs. Host en ratones híbridos F1 (CBA/JxC57BL/6). *VacciMonitor* 2011; 20 Supplement 1: pág 8.

- (50) Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, et al. Role of aluminum- containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005; 23:1588-1595.
- (51) Dupuis M, Denis-Mize K, La Barbara A, et al. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur J Immunol* 2001; 31:2910-2918.
- (52) Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, et al. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* 2002; 168:926-932.
- (53) Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, et al. Dendritic cell internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 1998; 186:18-27.
- (54) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
- (55) Waeckele-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 475- 482.
- (56) Barr IG, Mitchell G. ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade. *Immunology and Cell Biology* 1996; 74: 8-25.
- (57) Verma JN, Rao M, Amselem S, et al. Adjuvant effects of liposomes containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. *Infect Immun* 1992; 60:2438-2444.
- (58) Waeckele-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 475- 482.
- (59) Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 2004; 22:3127-3135.
- (60) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- (61) Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, et al. Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. US Patent 5, 597,572. 1997 Jan. 28.
- (62) Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Bisset G, García L, Puentes G, Sampedro MC, Sotolongo F, Xochitl Le Riverend E, Galguera M. Método para la obtención de una vacuna de amplio espectro protector contra *Neisseria meningitidis* del serogrupo B y la vacuna resultante. Patente Cubana CU 21888 A1; 1989.
- (63) Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Bisset G, García L, Puentes G, Sampedro MC, Sotolongo F, Xochitl Le Riverend E, Galguera M. Method for obtaining a vaccine with wide protective range against group B *Neisseria meningitidis*, the resulting vaccine, gamma globulin and transferfactor. European Patent EP 0301992; 1995.
- (64) Sierra VG, Campa HC, Valcárcel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Annals*. 1991; 14:195-210.
- (65) Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Bracho G, Díaz M, Zayas C, et al. Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection of Cuban anti-meningococcal BC vaccine. *Infect Immun* 2001; 69:4502-8.

- (65a) Rodríguez T, Pérez O, Menager N, Ugrinovic S, Bracho G, Mastroeni P. Interactions of proteoliposomes from serogroup B *Neisseria meningitidis* with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery. *Vaccine* 2005; 23:1312–13.
- (66) Pérez O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, González D, et al. Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine* xxx (2005) xxx–xxx
- (67) Pérez O, Lastre M, Bracho G, Del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al. Bacterial derived proteoliposome for allergy vaccines. *Vaccine* 2006; 24 (Supl. 2):34.
- (68) Del Campo J, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, González E, Bracho G, et al. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods* 2009; 49:301–308.
- (69) (68a) Del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gil D, Zayas C, et al. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants. *Vaccine* xxx (2005) xxx–xxx.
- (70) Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Pérez O, Petrovsky N. AFCo1, a meningococcal B-derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 and 5. *Malaria Journal* 2009, 8:35.
- (71) Cabrera O, Cuello M, Thörn K, Persson J, Lindqvist M, Lastre M, et al. gD2 recombinante coadministrada con AFCo1 nasal protege contra el reto con virus herpes simple tipo 2. *VacciMonitor* 2011; 20 (Supl. 1): 5.
- (72) Cuello M, Cabrera O, Thörn K, Lindqvist M, Persson J, Lastre M, et al. AFCo1 como adyuvante mucosal para enfermedades de transmisión sexual. *VacciMonitor* 2011; 20 (Supl. 1): 7.
- (73) Tamargo B, Ramírez W, Márquez Y, Labrada A, Fresno M, Sierra VG. New proteoliposomal formulation from *N. meningitidis* serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antimeningococcal protectogenic potencial as well as Th1 adjuvant capacity. *BMC J Immunol* 2011; (Accepted).
- (74) Tamargo B, Fleitas C, Infante JF, Márquez Y, Ramírez W, et al. Evaluación inmunotóxica de nuevas formulaciones adyuvantes nanoparticulados sin Al(OH)₃ ensayadas como candidatos vacunales contra *Neisseria meningitidis*. *VacciMonitor* 2011; 20 (Supl.1): 9.
- (75) Acevedo R, Callicó A, Del Campo J, González E, Cedré B, González L, et al. Intranasal administrations of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 2009; 49:309–315.
- (76) Tamargo B, Rosario LA, Batista N, Arencibia DF, Fernández K, Villegas A, et al. Vacuna experimental acelular en forma de cocleatos derivados de proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar *canicola*, confiere protección contra el reto. *VacciMonitor* 2011; (Aceptada).
- (77) Fernández S, Reyes G, Gaillard ME, Fingerhann M, Bottero D, Fernández Y, et al. *Bordetella pertussis* derived proteoliposome as acellular vaccine candidate.

Preliminary antigenic and biological characterization. *VacciMonitor* 2010; 19 (Suppl. 2).

- (78) Estévez F, Carr A, Solorzano L, Valiente O, Mesa C, Barroso O, et al. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine* 1999; 18(1-2):190-7.
- (78a) Mesa C, De León J, Fernández LE. An effective adjuvant for generation of CTL responses to peptide and protein antigens. *Vaccine* 2006; 24:2692-2699.
- (79) Mesa C, De León J, Rigley K, Fernández LE. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine* 2004; 22(23-24):3045-52.
- (80) Ramos TI, Baladrón I, Solares AM, Valenzuela CM, García E, Cintado A, et al. Application of cigb-228 with adjuvant vssp in high-grade cervical lesions. *VacciMonitor* 2010; 19 (Suppl. 2):137.
- (81) Domínguez A, Tamayo M, Pérez IY, Salas H, Pérez O, Batista A. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor* 2009; 18 (3): 13-17.
- (82) Batista A, Murillo G, Pérez U, Tur E, Portuondo D, Pérez O. Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCo1 por el método de HET-CAM. *VacciMonitor* 2011; 20(1):22-27.
- (83) Batista V, Quattrocchi V, Olivera C, Langellotti JS, Pappalardo S, Di Giacomo C, et al. Adjuvant effect of CliptoxTM on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. *Vaccine* 2010; 28: 6361- 6366.
- (84) Luzardo M del C, Calderón L, Martínez Y, Labrada A, Facenda E, Álvarez CM, et al. Lípidos liposomales como inmunoadyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y de los alérgenos principales del ácaro *Dermatophagoides siboney*. *Biotecnología Aplicada* 2006; 23(4):330-336.
- (85) Morris HJ, Martínez C, Abdala RT, Campos D. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 18(2):130-7.
- (86) Martínez C, Tamayo V, Favier P, Castillo JR, Hernández R, Sierra VG. Efecto inmunomodulador de la solución CM-95 tratada magnéticamente en ratones Balb/c inoculados con 5-fluorouracilo. *VacciMonitor* 2011; 20(1):13-21.
- (87) Martínez C, Toledano M, Rodríguez G, Andina L, Lassalle I, Sierra VG. Solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de Freund para la obtención del suero de Coombs en conejo. *VacciMonitor* 2009; 18(3): 5-12.
- (88) Guillén G, Aguilar JC, Dueñas S, Hermida L, Guzmán MG, Penton E, et al. Virus-Like Particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Ninth Global Vaccine Research Forum and Parallel Satellite Symposia, Bamako, Mali, 6-9 December 2009. *Proceed in Vaccinology* 2010; 2: 128-133.
- (89) Rodríguez-Alonso I, Soria Y, García D, García-Díaz D, Santisteban Y, Iglesias E. Adjuvant effect of ims 4112 over a multiepitopic protein of HIV-1 and comparison with a multiantigenic formulation using VLP from HBV. *VacciMonitor* 2010; 19 (Suppl. 2): 265-273.

- (90) Valdés I, Hermida L, Martín J, Menéndez T, Gil L, Lazo L, et al. Immunological evaluation in nonhuman primates of formulations based on the chimeric protein P64k-domain III of dengue 2 and two components of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; 27:995-1001.
- (91) Bernardo L, Pavón A, Hermida L, Gil L, Valdés I, Cabezas S, et al. The two component adjuvant IC31® potentiates the protective immunity induced by a dengue 2 recombinant fusion protein in mice. *Vaccine* xxx (2011) xxx–xxx.
- (92) Tamargo B, Gould-Fogerite S, Sierra VG. Estructuras cocleares, prometedores sistemas particulados, de amplio uso en biomedicina y salud. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones (En prensa).
- (93) Aggerbeck H, Heron I. Adjuvanticity of aluminium hydroxide and calcium phosphate in diphtheria-tetanus vaccines-I. *Vaccine* 1995; 13:1360 -1365.
- (94) Hem SL, White JL. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants. *Pharm Biothech* 1995; 6:249-276.
- (95) Jiang D, Premachandra GS, Johnston C, Hem SL. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine* 2004; 23: 693-698.
- (96) Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, et al. Adjuvant a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 1993; 11: 293- 306.
- (97) Kumar S, Jones TR, Oakley MS, et al. CpG Oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun* 2004; 72:949-957.
- (98) Del Giudice G, Hilbert AK, Bugarini R, et al. An MF59 adjuvanted inactivated influenza vaccine containing A/Panama/1999(H3N2) induced broader serological protection against hetero variant influenza virus strain A/Fujian/2002 than a subunit and a split influenza vaccine. *Vaccine* 2006; 24:3063-3065.
- (99) Allison AC, Squalene and aqualene emulsions as adjuvant. *Methods* 1999; 19:87-93.
- (100) Oliveira GA, Wetzel K, Calvo-Calle JM, et al. Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial. *Infect Immun* 2005; 73:3587-3597.
- (101) Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996; 13:1-55.
- (102) O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery system. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2:269-283.
- (103) O'Hagan DT, Singh M, Ulmer JB: Microparticle based technologies for vaccines. *Methods* 2006; 40:10-19.
- (104) Morein B, Bengtsson KL. Immunomodulation by ISCOMs, immune stimulating complexes. *Methods* 1999; 19:94-102.
- (105) Skene CD, Sutton P. Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods* 2006; 40:53-59.

- (106) Lederer E. New developments in the field of synthetic muramyl peptides, especially as adjuvants for synthetic vaccines. *Drugs Exp Clin Res* 1986; 12:429-440.
- (107) Allison AC. Immunological adjuvants and their modes of action. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997; 45:141-147.
- (108) Chedid L, Audibert F, Jolivet M. Role of muramyl peptides for the enhancement of synthetic vaccines. *Dev Biol Stand* 1986; 63:133-140.
- (109) Peppoloni S, Ruggiero P, Contorni M, et al. Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2:285-293.
- (110) Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoril lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotech* 1995; 6:495-524.
- (111) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-760.
- (112) Kliman DM. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int Rev Immunol* 2006; 25:135-154.
- (113) Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral- mucosal adjuvant and antigen vector system. *Vaccine* 1993; 11:1179-1184.
- (114) Boland G, Beran J, Lievens M, et al. Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. *Vaccine* 2004; 23: 316-320.
- (115) Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2- type response. *J. Immunol* 2004; 172:6922-6930.
- (116) Link C, Gavioli R, Ebensen T, et al. The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol* 2004; 34:899-907.
- (117) Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002; 20 (Suppl 3): S7-S12.
- (118) Hawkins LD, Ishizaka ST, McGuinness P, et al. A novel class of endotoxin receptor agonists with simplified structure, toll- like receptor 4- dependent immunostimulatory action, and adjuvant activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:655-661.
- (119) Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, et al. Enhancement of antigen – specific immunity via the TLR4 ligands MpL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 219-229.
- (120) Dockrell DH, Kinghorn GR. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:751-755.
- (121) Johnson AG. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:277-289.
- (122) Banyer JL, Hamilton NH, Ramshaw IA, Ramsay AJ. Cytokines in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* 2000; 2:359-373.

- (123) Proietti E, Bracci L, Puzelli S, Di Puchio T, Sestili P, De Vincenzi E, et al. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J Immunol* 2002; 169:375-383.
- (124) Nohria A, Rubin RH. Cytokines as potential vaccine adjuvants. *Biotherapy* 1994; 7:261-269.
- (125) Scott P, Trinchieri G. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. *Semin Immunol* 1997; 9:285-291.
- (126) Kim JJ, Yang J, Manson KH, Weiner DB. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN-gamma, or IL-4 gene adjuvants. *Vaccine* 2001; 19:2496-2505.
- (127) Iwasaki A, Stiernholm BJ, Chan AK, et al. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding co-stimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* 1997; 158:4591-4601.
- (128) Morris HJ, Martínez C, Abdala RT, Campos D. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 18(2):130-7.
- (129) Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 2009; 183: 6186-6197.
- (130) Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 411-416.
- (131) Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008; 181: 17-21.
- (132) Warshakoon HJ, Hood JD, Kimbrell MR, Malladi S, Wu WY, Shukla NM, et al. Potential adjuvant properties of innate immune stimuli. *Hum Vaccin* 2009; 5: 381-394.
- (133) Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 2010; 2 (Suppl 3): C25-C36.
- (134) Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS, S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 86-91.
- (135) Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 2008; 359: 2521-2532.
- (136) Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33: 492-503.
- (137) McGuirk P, Mills KH. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1 or Th2 inducing pertussis vaccines. *Infect Immun* 2000; 68: 1383-1390.
- (138) Safe Vaccine handling, cold chain and immunizations. Geneva: World Health Organization, 1998.
- (139) Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002; 20 (Suppl. 3):S40-S43.

- (140) Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001; 124: 1821-1831.
- (141) Brenner A. Macrophagic myofasciitis: a summary of Dr. Gherardi's presentation. *Vaccine* 2002; 20 (Supl. 3):S5-S6.
- (142) WHO. Vaccine Safety Advisory Committee. Macrophagic myofasciitis and aluminum-containing vaccines. *Weekly Epidemiological Record* 1999; 41:338-340.
- (143) Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines.US perspective. *Vaccine* 2002; 20 (Supl. 3): S18-S23.
- (144) Emea/chmp/veg/134716/2004. Guideline on adjuvants in vaccines for human use. London, January 20, 2005; págs10-18.
- (145) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 2005; Nov, 6(11):1123-32.
- (146) Soler DC, McCormick TS. The Dark Side of Regulatory T Cells in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2011; 131:1785-1786 doi:10.1038/jid.2011.200.
- (147) Xie M-H, Aggarwal S, Ho W-H, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(40), Octubre 6: 31335-31339.
- (148) Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology* 2011; 23(3):159–163. doi:10.1093/intimm/dxr001.
- (149) Jerud, ES; Bricard G, Porcelli SA. "Natural Killer T cells: Roles in Tumor Immuno-surveillance and Tolerance". *Transfus Med Hemother* 2006; 33(1):18-36. doi:[10.1159/000090193](https://doi.org/10.1159/000090193).
- (150) King C, Tangye SG, Mackay CR. T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26:741-66.

Autores:

Prof. Dr. V. Gustavo Sierra González.

Dr. C. Académico de Mérito de la ACC.

Instituto "Finlay". Centro de Investigación, Desarrollo y Producción de Vacunas y Sueros.

Código Postal 11600. La Lisa. Ciudad Habana. Cuba.

E-mail: gustavosierra6352@yahoo.com, (Autor para correspondencia).

Prof. MSc. Beatriz Tamargo Santos.

Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.

Departamento de Tecnología y Control de los Medicamentos.

Jefa de la Disciplina Inmunología y Biotecnología.

La Lisa. Ciudad Habana. Cuba.

E-mail: beatrizts@ifal.uh.cu,

Presentado: 3 de octubre de 2011

Aprobado para publicación: 18 de diciembre de 2011