

Excmo. Sr. Director
Excmas Sras. Académicas
Excmos Sres. Académicos
Señoras y señores:

Guardo un gran agradecimiento a la Real Academia de Farmacia por haberme elegido para cubrir la vacante de la medalla número cuarenta y cuatro correspondiente a Doctor en Farmacia. De manera muy especial a los Excmos. Señores Académicos y profesores de la Universidad Complutense de Madrid:

Don Ángel Vian Ortuño,
Doña María Cascales Angosto y
Don León Villanúa Fungairiño

que, con entusiasmo, suscribieron y apoyaron mi candidatura. Al profesor Villanúa tengo que agradecer además, el haber dedicado concentración y tiempo de su descanso veraniego con su familia, a la preparación del Discurso de Contestación, que, como es costumbre en él, ha sido una labor minuciosa de estudio del tema que sobre investigación de vacunas, tengo el honor de desarrollar en este Acto Académico.

No debo pasar por alto la gratitud y estima que me une a los Profesores Santos Ruiz, Director honorario de esta Real Academia de Farmacia; Cadórniga Carro y Portolés Alonso, Director y Secretario respectivamente de esta Corporación; Rodríguez-Villanueva, Cabezas Fernández del Campo, de quienes tanto he aprendido y mucho afecto he recibido.

Quiero expresar mi buena amistad y simpatía hacia don Eduardo Rodríguez-Rovira Presidente de SmithKline Beecham, que tantas veces me ha estimulado en el trabajo y en el estudio; a los profesores Don Josep Vaqué y Ralfart, Presidente de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, que me ha distinguido y mencionado en ocasiones memorables; Don Juan del Rey Calero, Catedrático de Medicina Preventiva y Social, que ha pro-

PRESENTACIÓN

En el estudio que presentamos a continuación, se encuentra una **primera parte** dedicada a la **investigación del proceso etiopatogénico**¹. Es en esta fase en la que debe basarse el desarrollo de las nuevas vacunas. Le sigue una **segunda parte** de consideraciones básicas sobre las **investigaciones del sistema inmunitario y de sus respuestas protectoras**. A continuación, se establecen las **condiciones mínimas** que deben cumplir las vacunas que se investigan; se estudian los métodos de identificación y de análisis de antígenos de las vacunas, y los **procedimientos actuales más eficientes de investigación y de desarrollo de nuevas vacunas**.

Indudablemente, aquí no se pueden contener todos los avances que en inmunología y en el desarrollo de vacunas se están realizando durante los últimos diez años, pero la mayor aspiración del estudio consiste en fundamentar, científica y técnicamente, **grandes esperanzas** en que en un futuro próximo se dispondrá, al menos, de vacunas más seguras y eficaces, que prevengan, controlen y probablemente, erradiquen algunas enfermedades transmisibles². Dada la situación de la investigación del sistema inmunitario y de las posibilidades de actuar y de modular las respuestas, las aspiraciones llegan, al menos, a conseguir **algunas vacunas terapéuticas** o curativas destinadas a sanar de algunas **infecciones crónicas**³.

¹ Field BN. (1994) *AIDS: Time to turn to basic science*. Nature, 369:95.

² The Jordan Report. Accelerated Development of vaccines 1996. Status of vaccines under development, 1996, pág. 63-69).

³ Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF, and Anderson RM. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human population. Nature, 365:797.

LAS NUEVAS VACUNAS INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Por el Excmo. Sr. D. DAVID MARTÍN HERNÁNDEZ

*EL MONUMENTO MÁS MARAVILLOSO, LA
OBRA DE ARTE MÁS TRASCENDENTAL, VALE
MENOS QUE UNA VIDA HUMANA.*

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

INTRODUCCIÓN

Las vacunas constituyen uno de los logros más importantes de la inmunología y de la biomedicina.

En la introducción histórica del discurso de ingreso en Mayo de 1992⁴, se hizo un breve recorrido sobre los antecedentes de las vacunas; se trató de recordar los hechos acontecidos a través de los tiempos, y se consideraba entonces que, cuando se había dispuesto de una vacuna segura y eficaz, y se había facilitado su utilización en Salud Pública, generalmente, se habían conseguido **resultados muy positivos** en la lucha contra la infección⁵.

La vacuna del virus *vaccinia*, empleada por primera vez por **Jenner**, quien en 1796 inició con ella⁶ el empleo de esta clase de **agentes inmunizantes** para combatir la viruela, y predijo la desaparición de esta enfermedad mediante su utilización, **inició un camino de impacto trascendental** sobre los programas sanitarios en todo el mundo⁷.

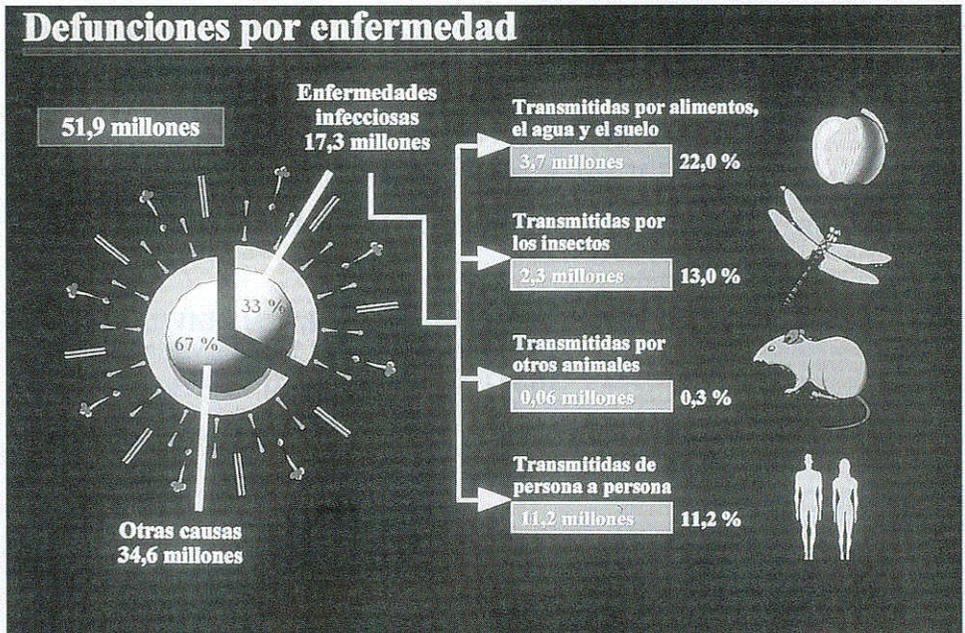
⁴ Martín Hernández, David. Discurso de Ingreso en Real Academia Farmacia Instituto de España Introducción Histórica. pág. 9-18.

⁵ WHO, 1996. The State of the World's vaccines and immunization. World Health Organization. United Nations Children's Fund. Geneva, 1996.

⁶ Jenner E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the wester counties of england, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. London, 1798. Reprinted in Camac CNB de. Classics of medicine and surgery. New York: Dover, 1959:213-240.

⁷ Fenner F, Henderson DA, Arita 1, Jezk Z, Ladnyo-D. (1988). Smallpox and its eradication. WHO, Geneve, pág. 1-1460.

El objetivo de hacer desaparecer una enfermedad de la faz de la Tierra se cumplió, y el 9 de diciembre de 1979 se firmó el **acta oficial de la O.M.S.** certificando su **erradicación global** (fig.1).

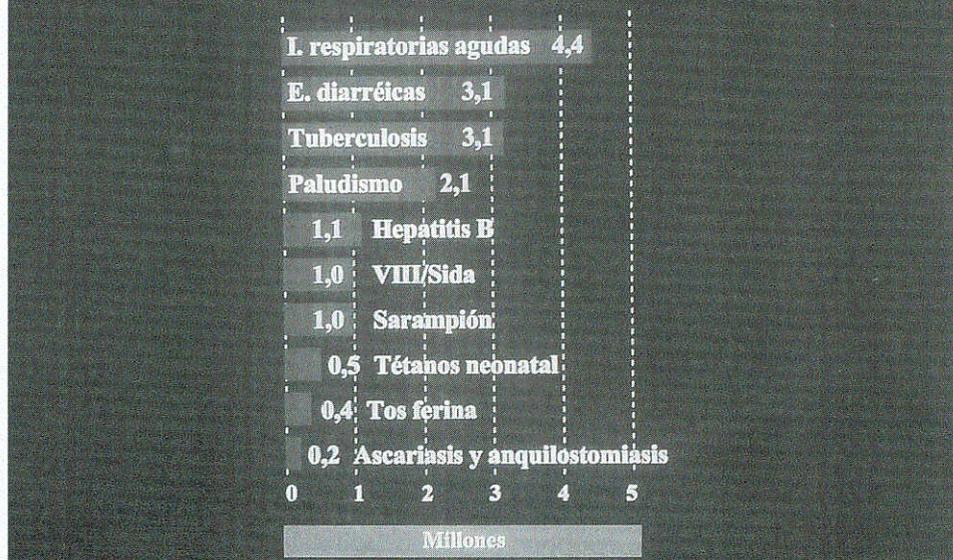


Es grande la deuda que España, América y Filipinas tiene con **Francisco Javier de Balmis**, “*el Jener español*”, director de la expedición llena de peligros y de incesantes desvelos para transportar desde **España al Nuevo Mundo** el virus de la viruela preservado en niños en disposición de obtenerlo, de brazo a brazo, para vacunar durante largos viajes. De esta forma, se consiguió en la América Española y en las Islas Filipinas, la profilaxis antivariólica (fig.2)⁸. Así mismo, debemos a **Jaime Ferrán** que, en su afán investigador, aún sin disponer de los medios mínimos necesarios, en un ambiente hostil muy alto que le atacaba para desmoralizarlo y despectivamente le apodaba como “*el bacteriólogo de Tortosa*”, lograra utilizar, aunque prematuramente, la primera vacuna contra una enfermedad epidémica bacteriana tan grave como el **cólera**.

Se pueden citar numerosos ejemplos de éxitos magníficos en el control de varias enfermedades infecciosas y de millones de vidas salvadas, especialmente de niños, atribuibles a las inmunizaciones frente a las infecciones. **Cuando se comparan** las gráficas epidemiológicas correspondientes a las tasas de **morbilidad y de mortalidad**, ocasionadas por enfermedades tales como el tétanos, po-

⁸ De Historia de la Medicina Española por Anastasio Chinchilla.

Las 10 infecciones más mortíferas



liomielitis, **difteria**, rubéola, sarampión y otras, **antes y después** de disponer de una vacuna segura y eficaz, **se evidencia** el extraordinario **beneficio** que la vacunación ha supuesto para el estado de salud de las poblaciones que han tenido acceso a este medio tan eficaz de **medicina preventiva**.

Los programas de inmunización promovidos por la Organización Mundial de la Salud, y por otras organizaciones sanitarias y humanitarias internacionales o nacionales, en los países en desarrollo, significan un ahorro inmenso de vidas y una disminución notable de individuos **discapacitados**.

Las vacunas existentes, en el momento en que se efectúa este estudio, consisten, mayoritariamente, en agentes microbianos muertos o **atenuados**, o algunos de sus componentes, desprovistos de acciones patógenas. Con su utilización se ha logrado **disminuir la incidencia de las morbilidades y de las mortalidades** de un considerable número de enfermedades transmisibles. Pero estas vacunas presentan algunos inconvenientes tales como que, a veces, no se puede comprobar que los gérmenes que contienen están completamente inactivados, o muertos, o suficientemente atenuados, así como la dificultad que supone resolver el problema de estabilización de las mutaciones genéticas, especialmente en el caso de los virus de **genoma RNA**.

La necesidad de disponer de **vacunas mejoradas**, cada vez más seguras, más eficaces, de **costos económicos** más reducidos, de aplicaciones más sencillas - por ejemplo las de administración por *vía oral*- es **esencial**. Cada día aparecen,

con mayor frecuencia, resistencias a los **antibióticos** que habían sido **eficaces** para combatir muchas infecciones. Algunas veces, las vacunas llegan a convertirse en el único medio para resolver los problemas de salud que plantean las mencionadas resistencias. Además, como consecuencia de los cambios de las condiciones de vida, las alteraciones climáticas, el estado atmosférico, la introducción de técnicas agrícolas innovadoras que perturban el hábitat natural, y de otros factores, surgen nuevas enfermedades transmisibles.

Aparte del objetivo principal de la prevención de procesos infecciosos causados por **bacterias** y **virus**, o de infestaciones por **parásitos**, que tradicionalmente cubre la utilización de las vacunas preventivas o **profilácticas**, han surgido otras posibles aplicaciones de esta herramienta de inmunización. Se trata de la posibilidad de llegar a disponer de **vacunas terapéuticas**⁹, es decir de estímulos suficientes del sistema inmunitario para eliminar las infecciones e infestaciones ya establecidas. Esta propiedad facilitaría la lucha frente a ciertas **cronicidades**, y haría menos difícil la erradicación de enfermedades mediante la eliminación de los agentes causantes. También, de la misma manera que con una vacuna típica se puede aumentar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno, o a una variedad de **epítomos** de un **antígeno**, en los casos de enfermedades autoinmunes¹⁰, existirá en el futuro la posibilidad de disminuir la respuesta a los epítomos que causan o agravan estas afecciones¹¹. Es posible la inmunización frente a **células neoplásicas**, en experimentación con modelos de cáncer murino: la vacunación con antígenos adecuados, ha prevenido la **metástasis tumoral**, y se ha conseguido prolongar la vida del animal afectado.

Estas y otras oportunidades que ofrecen en estos momentos los avances logrados en el campo de la **investigación inmunológica**, si son **enfrentadas** a la intranquilidad que produce la presencia de brotes epidémicos tales como los de difteria -que recientemente se han producido en el Norte de Europa, relacionado con las inestabilidades y relajamiento de ciertas políticas sanitarias, o con los cambios de las condiciones socioeconómicas de algunas sociedades e instituciones-, y a la aparición de nuevos agentes **patógenos exóticos**, que han permanecido escondidos en animales portadores durante siglos¹², **constituyen en conjunto factores importantes** que explican que se haya atendido más a la aplicación de los calendarios vacunales, y de las coberturas de las vacunaciones consideradas como universales.

⁹ Cohen IR, (1992). The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today* 13:490-494.

Y Cohen I R, (1992) The cognitive principal challenges clonal selection. *Immunol today* 13: 441-444,

¹⁰ Sela M, and arnon R, (1992), Synthetic approaches to vaccins for infection and autoimmune diseases. *Vaccine*, 10:991-999.

¹¹ Rojo JM. (1996) *Linfocitos T autorreactivos. Autoinmunidad: Algunos aspectos básicos*. Monografía, Real Academia de Farmacia, pág. 100-104.

¹² Department of Health and Human Services. (1992). U.S. Report of Task Force on Microbiology and Infection disease. Public Health Service. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

También, se ha despertado un mayor interés en disponer de nuevas vacunas frente a los **patógenos aún descontrolados** inmunológicamente, y contra aquellos que, aunque se han considerado controlados, van adquiriendo mayores virulencias y resistencias a los tratamientos medicamentosos. Desafortunadamente, aún **no existe la vacuna ideal**, que sería la que reuniera las condiciones de: **segura, estable, totalmente eficaz**, que se pueda administrar por **vía oral**, en **una sola dosis en el momento de nacer**, que proporcionara **protección para toda la vida**, y a un **precio razonable**. La investigación avanza hacia el logro de muchos de esos importantes objetivos y, como el profesor Portolés¹⁵ presentó en esta Real Academia de Farmacia, continúa vigente sus sabias palabras: *«un conocimiento perfecto de la complejidad de las respuestas inmunitarias, así como de sus posibilidades de modulación, constituyen un gran reto para la investigación biomédica actual, que intenta cumplir con el objetivo de salud integral para el año 2000»*.

¹⁵ Portolés A, Nuevos horizontes en Biomedicina y Farmacoterapia, 1986, 1: pág. 29-106.

CAPÍTULO I

1. BREVE HISTORIA DE LAS VACUNAS

En este apartado se desea dar una mirada muy breve a las raíces históricas de las vacunas, de las vacunaciones y de lo que constituye actualmente la disciplina, o ciencia inmunológica aplicada a la prevención de las infecciones.

Desde siempre, las enfermedades infecciosas han sido acompañadas por sufrimientos físicos, por los trastornos biológicos ocasionados al individuo y porque la sociedad ha penalizado, a veces cruelmente, a los infectados e infecciosos. Frecuentemente se les ha aplicado penalidades psíquicas, como separarles de sus familiares, compañeros y amigos, alejarles de la sociedad, encerrarles en lazaretos, en barcos inmovilizados y anclados, lejos del acceso de los demás. Frente a ellos se han tomado innumerables medidas cautelares que, para prevenir el posible **contagio** de los sanos, les ha discriminado y aumentado sus sufrimientos.

Por otra parte, desde la más remota antigüedad los humanos hemos venido observando que aquellos individuos que sobrevivían a una enfermedad, quedaban protegidos y generalmente no volvían a experimentarla, al menos de una forma tan virulenta. Sobre este hecho confirmado, generación tras generación, se desarrolló el intento de aprovechar y aplicar el conocimiento adquirido, a la evitación o atenuación del sufrimiento y del **riesgo de morir** siendo víctima de algo que podía ser prevenido.

1.1. Los primeros datos conocidos sobre la variolización

Las repetidas exposiciones al virus de la viruela aumentaron la probabilidad de poder confirmar el principio arriba mencionado y aplicable a esta dolencia, hasta que, deliberadamente, algunos individuos se provocaban la inducción de la enfermedad, con la esperanza de librarse de males mayores.

Algún autor sostiene que en el *Atharva Veda*, un texto religioso pre-Hindú de hace unos 1000 años a.C., ya hay una descripción de la variolización, pero no existen pruebas científicas que lo avalen¹⁴.

Hacia el año 590 a.C., parece que en China, mediante la **inoculación intranasal** de materiales procedentes de las pústulas de un enfermo, y en India, por inoculación mediante **escarificación** dérmica de pequeñas cantidades de linfa, pus o costra de un paciente, se efectuaron las primeras inmunizaciones frente a la viruela.

Todos los datos históricos confirman que en el siglo VI, **la variolización se originó en China y en India**, de forma simultánea apreciablemente. Desde esas zonas geográficas, el procedimiento se fue extendiendo hacia las regiones más occidentales del mundo conocido.

Se sabe que, un siglo antes de que Jenner iniciara la variolización en **Berkeley**, un pueblo del sudeste de Inglaterra, los chinos preparaban unas píldoras con macerados de pulgas de vacas blancas que empleaban como prevención de la viruela por vía oral. Probablemente, se trate del primer intento de utilización de una vacuna por la mencionada vía de administración¹⁵.

Los monjes budistas practicaban y recomendaban la variolización¹⁶ durante el reinado de Jen Tsung en los años de 1022 a 1063.

Los chinos sospechaban que la práctica de la variolización que ellos empleaban, tenía un origen indio o persa¹⁷.

También hay constancia de que en el siglo VII, los budistas de India ingerían veneno de serpiente con la idea de protegerse frente a los efectos tóxicos de la mordida por el reptil. Se puede considerar como un antecedente de búsqueda de una inmunización inducida por una **sustancia** parecida a la de la vacuna de toxoide¹⁸.

1.2. La era jenneriana y sus antecedentes

En los siglos XVII y XVIII, era una creencia popular en Europa que la infección sufrida por los ordeñadores de las vacas que poseían pústulas en las ubres, originaba la viruela, pero de una forma muy benigna, si era el caso, librándose de la muerte.

¹⁴ Majorn RH. (1954). *A History of Medicine*. Springfield. Thomas CC.(ed).

¹⁵ Wong KC, Wu LT.(1932). *History of Chinese Medicine*. Tientsin, Tientsin Press.

¹⁶ Hume EH. (1940). *The chinese Way in Medicine*. Baltimore, Johns Hopkins Press.

¹⁷ Huard PA, Wong K.(1968). *Chinese Medicine*. New York, McGraw-Hill.

¹⁸ DeBary WT. (ed). (1972). *The Buddhistn Tradition in India, China and Japon*. New York. Vintage Books.

En Inglaterra en 1721, Lady Mary Montagu, que había adquirido alguna información en Constantinopla, realizó algunos intentos de proteger a sus ciudadanos de la viruela variolizándolos con pus desecado procedente de pústulas de pacientes. De esta forma, ella logró algunos éxitos, pero se sabe que, al mismo tiempo, cultivó algunos fracasos¹⁹.

En 1774, **Benjamin Jesty**, granjero de Yetminster, después de haber contraído y curado de la viruela, vacunó deliberadamente a su mujer y a sus dos hijos para evitarles sufrir la epidemia.

Indudablemente, **Jenner**, como todo investigador, vivió algunos años de incertidumbre, de euforia y de gloria, pero también tuvo tiempo para darse cuenta de que, en algunos casos de variolización, su método no era tan eficaz, y se requería revacunar, es decir, reforzar la protección lograda con la primera dosis. Así mismo, con posterioridad, se fue desarrollando la idea de la atenuación de los gérmenes mediante el paso a través de distintas especies animales, o por las acciones de algunos agentes químicos, o del envejecimiento de cultivos, hecho que él no desconoció.

Era evidente que la infección con la linfa de las pústulas de las ubres de las vacas producía una sintomatología más benigna que la vacunación con el material de procedencia humana, pero no se sabía todavía que, aunque pertenecientes a la misma familia de *Poxviridae* y género *Orthopoxvirus*, el virus *vaccinia* era distinto del virus *variola*.

No cabe ninguna duda de que el mérito de la primera variolización por un método científico recae en Edward **Jenner**²⁰, quien, en 1796, tras informarse bien sobre el tema, mucho titubear, y realizar múltiples ensayos consigo mismo, inoculó por **escarificación dérmica** la linfa de una pústula de la mano de la ordeñadora Sarah Nelmes, al joven **James Phipps**. El pequeño no enfermó de gravedad tras la inoculación y, en cambio, resistió perfectamente la posterior contaminación con pus de viruela humana. Pasados dos años de la primera experiencia, y habiendo reunido muchos datos más, comunicó su descubrimiento a la Real Sociedad Científica de Londres que, en primera instancia, rechazó de plano la exposición del médico inglés, hijo de vicario protestante de Berkeley, por considerar insuficientes las pruebas.

Esto no constituyó ningún obstáculo para que, siguiendo el método de Jenner, ya en el año de 1801 se habían vacunado más de cien mil europeos. Jenner²¹ predijo la **erradicación de la viruela**. Pero la vacunación tenía muchos

¹⁹ Parish HJ. (1965). *A History of immunization*. London, E and S Livingstone.

²⁰ Jenner E. (1798). *An inquire into the Causes and effects of the Variolae Vaccinae*. London Low.

²¹ Jenner E.(1801). *The Origen of The Vaccine Innoculation*. London.

detractores, oponentes y recibía numerosas críticas. Algunos de cuyos problemas fueron corrigiéndose en los tiempo que siguieron.

También en España, la viruela constituía un problema sanitario importante, pero aún más podría serlo en algunas posesiones españolas de ultramar, que nunca habían sufrido esta enfermedad y los conquistadores la difundieron entre los indígenas de los pueblos descubiertos. Para propagar el uso de la variolización en esas zonas geográficas, se organizó una expedición filantrópica dirigida por el médico cirujano militar Don Francisco Javier **de Balmis Berenguer**²² que, sufragada por la Corona, y llevando a bordo veintidós niños *vacuniferos*, partió el 30 de noviembre de 1803, llevando la vacuna que de *brazo a brazo* se mantenía siempre disponible para realizar la variolización de los niños de los continentes de dominio español, en donde no existía, en aquel entonces, mejor medio de producir ni de conservar la vacuna. La expedición recorrió más de 100.000 kilómetros de América Central, Filipinas etc. A Balmis se le ha llamado **el Jenner español**, por su gran contribución a la prevención de la morbilidad y de las altas tasas de mortalidad que la viruela ocasionaba en el Nuevo Mundo.

La vacuna de la viruela obtenida según las directrices dadas por Jenner ofrecía, escasas garantías de **seguridad y de eficacia**. Para que demostrara la ausencia de peligros por otras infecciones y su verdadera potencia, era necesario introducir algunos cambios. A mediados del siglo XIX, se unificaron los métodos de preparación, adoptando que la linfa se extrajera de terneras, que se empleara glicerina como vehículo y evitar así las contaminaciones bacterianas.

En el año de 1966²³ todavía la **cifras de la viruela** eran las siguientes:

Casos en el mundo:	de 10 a 15 millones
Muertes por viruela/año:	2 millones
Zonas con endemidad:	31 países

Las intervenciones de los representantes nacionales en las Asambleas de Salud Mundial de la O.M.S. en favor de dedicar más fondos y concentrar más esfuerzos para terminar con los casos de viruela en el mundo fueron muy eficaces²⁴. Gracias a ellas, el día 19 de diciembre de 1979, *los miembros de la Comisión Mundial para la Certificación de la Erradicación de la Viruela, firmaron el acta correspondiente*, confirmando que ya no existía ningún caso de enfermedad por el virus²⁵.

Desde la aplicación de la primera vacuna de Jenner en el año 1796, se originó una gran inquietud e interés científico en pensamientos que daban lugar a las más dispares teorías interpretativas sobre el fenómeno de la vacunación y sobre los orígenes de la **enfermedad infecciosa**.

²² Mazana CJ.(1996). Francisco Xavier de Balmis y Berenguer(1753-1919). El Jenner Español. Un Capítulo en la Historia de la profilaxis antivariólica.

²³ 19th World Health Organization (1967). WHO.

²⁴ Global Eradication of Smallpox Final Report (1980).WHO.

²⁵ WHO. (1979). Certification of Smallpox Eradication From the World.

1.3. La era bacteriana

Transcurridos unos 80 años sucedió que Robert Koch, trabajando en su laboratorio, en 1876, aprovechando los avances conseguidos en el cultivo de bacterias, logró cultivos puros del **bacilo del ántrax**, aislarlo e inocularlo al ratón. El ratón sufrió la enfermedad y el científico demostró la importancia de su trabajo. Sobre esta base más sólida, se desarrollaron nuevos medios de cultivos bacterianos y se identificaron agentes causales de varias enfermedades. Robert Koch demostró que el bacilo del ántrax poseía la capacidad de formar **esporas** y de sobrevivir indefinidamente.

Roux y Yersin demostraron que los filtrados de algunos cultivos de gérmenes libres de cuerpos bacterianos, propagaban enfermedades tales como la difteria el tétanos, la gangrena gaseosa, el botulismo, con lo que quedaba claro que existían **exotoxinas** capaces de producir enfermedades.

1.4. La era de Pasteur

A finales del siglo XIX, se hizo patente el intento de aplicar los conocimientos adquiridos a la obtención de vacunas. El **epigrama de Pasteur** de "*la suerte favorece únicamente a las mentes preparadas*", fue aplicado por excelencia al desarrollo de vacunas.

Surgieron grandes estudiosos de la **ciencia biológica**, y **Louis Pasteur**, importante científico francés, tomó buena nota de los descubrimientos de la época, tales como los de los cultivos bacterianos. Tuvo un gran prestigio que le permitió crear una escuela de investigación. Pasteur, gracias a los descubrimientos de Koch sobre las posibilidades de **cultivar gérmenes** en lugar de utilizarlos completamente vivos para vacunas, trató de inocular suspensiones de gérmenes que había debilitado progresivamente. Demostró que el **agente infeccioso del cólera** aviar en cultivos expuestos al aire durante un fin de semana perdía virulencia, y servían como vacuna sin el riesgo de producir la enfermedad. Empleó el **virus salvaje de la rabia**, lo cultivó varias veces intracerebralmente en conejo hasta conseguir un **virus fijado**, como él lo llamó. Entonces desecó al aire la **médula espinal de conejo** que había sido inoculado con el virus, y de ese material preparó diversas suspensiones que constituían su vacuna antirrábica.

La historia de las vacunas es digna de ser relatada detenidamente, y es recomendable informarse a través de una obra especializada.

En esta breve descripción, únicamente se resume y deja constancia cronológica de lo que, con posterioridad a estas fechas tan memorables e importantes para la iniciación de las vacunaciones, se ha venido produciendo en el campo de los **productos inmunológicos**.

En el año 1918 ya se disponía de la vacuna antitifoidea, en 1924 del toxoide antidiftérico, posteriormente en 1927 la vacuna BCG antituberculosis, que actualmente está mejorándose, para aumentarle su inmunogenicidad; en 1925 se dispuso del primer toxoide antitetánico; en 1940 de la **vacuna contra el cólera**; en 1945 de la vacuna anti-tosferina; en 1947 de la **V. antigripal**; en 1948 la **V. anti-fiebre amarilla**; en 1948 de la **V. antipoliomielítica Salk** inyectable; en 1957 de la **V. antipolio Sabin oral**; en 1959 de la V. antisarampión; en 1964 de la V. antiparotiditis (**virus atenuados**); en 1967 la V. antirrubéola; en 1970 la V. antimeningocócica (**polisacáridos capsulares A+C**); en 1974 la V. antineumocócica; en 1982 la V. antihepatitis B obtenida por **ingeniería genética**; en 1983 la **vacuna antivariçela** (virus atenuados); en 1984 la V. antihemófillus influenzae b; en año de 1990, la primera vacuna frente a la hepatitis A.

1.5. El presente

Como ha podido observarse, a partir del año de 1988, después del éxito del empleo de la ingeniería genética, la mayor parte de las vacunas se desarrollan empleando tecnologías nuevas que ofrecen productos más **seguros** y más **eficaces**.

Hasta aquellos años, las **estrategias de investigación** de vacunas eran muy limitadas. En las últimas décadas, las opciones para estudiar **estructuras moleculares inmunógenas**, para construirlas y para obtenerlas industrialmente, han mejorado radicalmente. La reciente tecnología del DNA-recombinante, la aplicación de los métodos de **clonación molecular**, los procedimientos bioquímicos de purificación, y la ayuda que proporcionan los conocimientos de la **inmunología básica** de la vacunación, facilitan la disponibilidad de entidades moleculares puras con propiedades inmunógenas que pueden exaltarse o aumentarse mediante el empleo de vehículos adecuados, de vectores bacterianos y víricos, pero también de un grupo cada vez mayor y más eficaz de **adyuvantes** que estimulan, refuerzan y modulan las respuestas inmunitarias para acercarlas al punto óptimo deseado.

Las principales direcciones hacia donde se encamina la investigación de nuevas vacunas en el momento en que se escribe este estudio, se podrían resumir en los siguientes grupos:

- a) Vacunas de Ácidos Nucleicos.
- b) Vacunas de Antígenos Sintéticos y anti-idiotipos.
- c) Vacunas de Neoglicoconjugados.
- d) Vacunas de componentes purificados.
- e) Vacunas de Cepas Genéticamente modificadas.
- f) Vacunas con componentes novedosos de liberación de antígenos.

Es de esperar que progresivamente se vayan asignando prioridades a los proyectos cuyo datos de experimentación vayan ofreciendo mejores oportunidades de desarrollo.

CAPÍTULO II

2. INVESTIGACIÓN DEL PROCESO ETIOPATOGÉNICO

2.1. Breves consideraciones sobre los gérmenes causantes de las enfermedades

Debido al desarrollo de la genética molecular que se basa, en gran parte, en el estudio de los mutantes microbianos, las enfermedades infecciosas no constituyen el único puente entre la microbiología y la medicina.

A continuación se realiza una **breve consideración sobre los gérmenes causantes de las enfermedades**:

- VIRUS
- PARÁSITOS
- BACTERIAS
- HONGOS

Por otra parte, se recoge una tabla con el escenario simplificado de los principales microorganismos que son objeto de este estudio.

2.1.1. *Los virus*

Los virus son las estructuras biológicas más sencillas, metabólicamente inertes. No pueden crecer o replicarse en medios de cultivo artificiales sino que, obligatoriamente han de utilizar el metabolismo de las células vivas. La partícula viral nunca crece, ni sufre división binaria. Su reproducción corresponde solamente a la de su ácido nucleico, y su desarrollo es endocelular o dentro del mismo núcleo de la célula huésped. Las investigaciones sobre virus se realizan, principalmente, en cultivos celulares, en embriones y en animales de laboratorio. Las dimensiones de las partículas virales maduras o viriones, son demasiado pequeñas y comprendidas entre las 20 y las 350 milimicras (una micra la millonésima parte del metro).

Los **bacteriófagos** son virus bacterianos. Por su facilidad de manejo en el laboratorio, han servido como prototipos para investigar la naturaleza de ellos, aunque no sean exactamente comparables a los virus de los animales, ni a los de las plantas²⁶.

Los virus presentan una especificidad extraordinaria para causar la enfermedad. Frecuentemente, el diagnóstico de laboratorio de las infecciones virales se basa, en la demostración de las respuestas inmunitarias específicas. Estas se producen como consecuencia de la infección aguda, o del estímulo del sistema mediante la vacunación.

El desarrollo de la **inmunología celular** ayudará mucho a la investigación de vacunas²⁷.

Los **antígenos de superficie** de los virus son los más importantes por sus correspondientes especificidades de tipo, subtipo y hasta de cepa. Los **anticuerpos** producidos después de la infección o de la vacunación, producen en general su neutralización. Son **anticuerpos neutralizantes** inducidos como consecuencia de la **inmunidad adquirida**.

Los **antígenos de la cápsida** de los virus son de naturaleza proteica. En algunos virus pueden formar varias capas. Los correspondientes a la envoltura son también de naturaleza proteica, asociada a moléculas de glúcidos o de lípidos.

Los **antígenos profundos** de los virus, son proteínas internas del virión como la proteína matriz, o proteína-M, de los ortomixovirus. También pueden encontrarse numerosas **proteínas no estructurales** con propiedades antigénicas y antígenos solubles constituidos por fracciones proteicas muy diversas²⁸.

2.1.2. *Las Bacterias*

Las Bacterias son grupos muy diversos de microorganismos unicelulares, capaces de vivir, crecer y reproducirse por sí mismas. Las dimensiones de las bacterias están comprendidas entre las 0.4 y 1.0 (m (micras) de diámetro. Morfológicamente se distinguen las esféricas o **cocos**, con algunas desviaciones como la forma lanceolada de los **neumococos**; forma de grano de café, como

²⁶ McMichel, A. (1993) Natural selection at work on the surface of virus-infected cells. *Science*, 260:1771.

²⁷ Harper DR, (1994) *Molecular Virology*. BIOS Scientific Publishers, Oxford).

²⁸ Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, de Caril M, Flaccadori F and Ferrarri C, (1994) *Natural Variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. Nature*, 369:407.

los **gonococos** y **meningococos**; las alargadas o **bacilos**, y las formas espirales, de las cuales son subgrupos los **vibriones**, **espirilos** y **espiroquetas**. Los cocos se separan completamente después de su división celular. Cuando permanecen aislados, se denominan micrococos. Pueden presentarse también apareados (**diplococos**), en cadenas (**estreptococos**), agrupados irregularmente (**estafilococos**)²⁹. Cualquiera que sea la forma o el tamaño de la bacteria, todas tienen algunos aspectos estructurales comunes: son estructuras muy primitivas conocidas como células **procarióticas**. Consiste en una masa gelatinosa, **citoplasma**, dentro de una **membrana**, que generalmente la envuelve, una **pared celular**, rígida y porosa, a cuyo través pasa el agua y los nutrientes, y salen los materiales de desecho.

La membrana citoplasmática está formada por dos capas de **lípidos** y **proteínas** que actúan como **barreras** hacia el mundo externo.

Dentro del citoplasma bacteriano, se encuentra una madeja de doble entramado constituida por el ácido **desoxirribonucleico** o **DNA**: es el **cromosoma** de la bacteria, que contiene toda la información genética necesaria para su supervivencia celular. Es como si fuera su programa de ordenador, que contiene todas las instrucciones para la **síntesis de las proteínas**. El cromosoma, tiene la capacidad de replicarse por sí mismo, y pasa a las células descendientes. Está unido al citoplasma a través de una estructura llamada **mesosoma**.

Entre las otras estructuras del citoplasma se encuentran los **ribosomas**, constituidos por ácido ribonucleico o **RNA**, que son los responsables de fabricar las proteínas celulares bajo la dirección del cromosoma bacteriano.

De vez en cuando, la célula bacteriana puede contener pequeños fragmentos circulares de DNA que flotan libremente en el citoplasma: son **plásmidos**, que no intervienen en los procesos vitales celulares, sino en los de defensa frente al medio. Se desarrollan y reproducen independientemente del núcleo, y frecuentemente actúan como **antígenos**, que disparan los **mecanismos de defensa** frente a la infección. Estos mecanismos son las **cápsulas**, materiales viscosos segregados por ciertas bacterias para defenderse de las condiciones adversas, los **flagelos**, filamentos proteicos que permiten realizar algún movimiento dentro de los medios líquidos, y el **pelo o fimbria**, estructura proteica pilosa, que le permite adherirse a las superficies celulares que ataca.

Se conoce con el nombre de **citosol**, a todos los componentes solubles celulares.

²⁹ Jakatz E, Melnick JL, Adelberg, Brooks DF, Butel JS, and Ornston LN. (1991) *Medical microbiology*. Prentice-Hall, Princeton, NJ.).

Los componentes antigénicos de las bacterias

El ingreso de las bacterias en el organismo humano durante la infección, origina la formación de una serie de anticuerpos que, en general, aglutinan a los cuerpos bacterianos. No todos estos anticuerpos son protectores frente al germen, ni sus títulos guardan relación con el grado de protección. No obstante, son marcadores muy importantes para el diagnóstico de la enfermedad.

Las estructuras bacterianas poseen, especialmente en sus correspondientes superficies o paredes, **epítomos** que encajan en los receptores del sistema inmunitario, y que son los que podrían dar lugar a las respuestas de protección del individuo infectado.

Algunos antígenos bacterianos son heterogénicos, que coinciden con los **A, B, y H de Forssman** de los hematíes humanos que, además, se pueden encontrar en numerosas células. Otro más es el **hapteno de Wassermann**, presente en muchos tejidos, y en *Treponema pallidum*. La presencia de antígenos de grupo específico, permite clasificar a determinados géneros. Como las composiciones químicas de las bacterias gram-positivas son distintas de las gram-negativas, también se diferencian por sus constituyentes antigénicos.

En las bacterias gram-positivas, los **antígenos capsulares** tienen, en general, mayor importancia antigénica que la de los flagelos; por el contrario, los flagelos de las **gram-negativas** son **proteínas fibrosas** muy antigénicas denominados antígenos H, que son en general muy específicos.

El **peptidoglicano** de la pared celular juega solamente un papel **adyuvante del mosaico antigénico** de los antígenos de superficie de las bacterias gram-positivas. La inoculación al animal, dá lugar al desencadenamiento de reacciones análogas a las de las **endotoxinas** de los gérmenes gram-negativos. Los ácidos lipoteicoicos, constituidos por cadenas largas de ácidos teicoicos enlazados por un glicolípido, actúan como mediadores de adherencia de los estreptococos a las células epiteliales de las mucosas del individuo. La **proteína A de superficie**, parece estar implicada en la virulencia de los neumococos³⁰, en el animal de experimentación, desarrolla **respuesta inmunitaria protectora** y es objeto de estudio de varios proyectos de investigación de vacunas. El **polisacárido C**, constituido por ácidos teicoicos, como polímeros de **fosfato de ribinol**, conteniendo colina y galactosamina-6-fosfato, que se unen a los peptidoglicanos de la superficie externa de la pared celular. En las bacterias gram-negativas, se pueden encontrar antígenos superficiales exteriores, o productos de secreción, sin estructura física, denominados **antígenos K**.

³⁰ Briles DE, Yother J, McDaniel LS. (1988). Role of pneumococcal surface protein A, in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Rev infect Dis 10 (supl 2): S372-S374.

2.1.3. *Los Parásitos*

A los efectos de este estudio, se encuadran dentro del grupo de parásitos patógenos a todos los agentes animales que producen enfermedades tan evidentes como **anemias**, **díscnterías**, **encefalitis**, **neumonía**, y síntomas más ocultos, como reacciones de **hipersensibilidad o de alergias** en el hombre.

Se incluye desde los grandes Helmintos, cuyas dimensiones pueden alcanzar metros, como los **cestodos** (*Diphyllobotrium* y *Echinococcus*), hasta los Protozoarios intracelulares de dimensiones micrométricas³¹.

Los antígenos parasitarios constituyen un grupo muy complejo de **hetero-antígenos**, de naturalezas proteicas, glicoproteínas, y polisacáridos, con propiedades inmunógenas para el hoesped humano.

Muchas de las enfermedades parasitarias son causantes de morbilidades y de mortalidades importantes en todo el mundo

A la consecución de vacunas frente a estas enfermedades parasitarias, se han dedicado grandes esfuerzos durante más de 20 años y logrado muy pocos resultados.

Los parásitos patógenos poseen muchas más posibilidades de supervivencia y **ciclos vitales** muy complejos . Por la presentación de multitud de **epítomos distintos**, es **muy difícil** inmunizarse frente a ellos, aunque las nuevas vacunas ofrecen algunas esperanzas de futuro³².

Los antígenos parasitarios son muy diversos, como corresponde a la diversidad de los parásitos patógenos. Existen mosaicos antigénicos que solamente se liberan con la muerte del parásito. La inmunogenicidad de los antígenos para el hombre depende, en gran parte, del grado de adaptación del parásito. Los parásitos pueden inducir **inmunidad celular y humoral**, pero frecuentemente se adaptan y se convierten en especies **comensales**, como en el caso de la *Entamoeba coli*.

2.1.4. *Hongos*

Los hongos y actinomicetos patógenos contribuyen al aumento de la morbilidad y mortalidad humanas.

³¹ (WHO, 1995) Tropical Disease Research. (1995) Twelfth Programme Report. UNDP/World Bank WHO Special Programme for Research and training in Tropical Disease, Ginebra, pg.110. (Leishmaniosis dog vaccine trials in Brazil. (1994) TDR News 46:4.)

³² McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM and Kwiatkowski D, (1994) *Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria*. Nature, 371: 797.

Las **barreras** naturales inespecíficas y los mecanismos específicos adquiridos, pueden jugar un papel importante en la defensa frente a la infección por hongos oportunistas; los **macrófagos** alveolares o peritoneales, la **fracción C**, del complemento, se moviliza en los casos de parasitosis. Se considera que, en general, las defensas mediadas por **linfocitos T** son difíciles de encontrar frente a este tipo de infección.

2.2. La interpretación de la biología del agente patógeno. La investigación del proceso etiopatogénico³³

Para investigar una nueva vacuna que sea segura, eficaz y que proteja frente a la infección y a la enfermedad, es preciso conocer, entender e interpretar adecuadamente la biología del agente patógeno que se estudia³⁴, así como la respuesta inmunitaria innata e inducida que puede provocarse en el hospedador humano³⁵.

El **paradigma Th₁/Th₂**, proporciona un modelo útil para comprender la **patogénesis** de muchas enfermedades infecciosas y ayuda en la investigación de **nuevas estrategias** en el desarrollo de vacunas³⁶.

Es conveniente prestar atención a las siguientes circunstancias:

- a) Las características de la enfermedad causada: como se replica y divide el germen patógeno, su grado de patogenicidad varía entre márgenes muy amplios. La patogénesis, o acontecimientos que dan lugar a los signos y síntomas clínicos, constituye un cuerpo de información que, conjugado con todos los demás datos, orienta sobre el lugar donde, probablemente, se produzca una respuesta inmunitaria protectora y donde se podrían encontrar *rastros moleculares* que podrían servir de apoyo al **proyecto de investigación**.
- b) Hay probabilidades de encontrar respuesta inmunitaria constituida por **IgA en las mucosas, puerta de entrada** del germen y por **IgG en la sangre**, casi inmediatamente después de que se produce el contacto **contagioso**. Es difícil detectar marcadores de infección en el caso de patógeno endocelular. Se podría encontrar la presencia de toxinas circulantes, cuando el germen fuera productor de ella.

En el origen y en el desarrollo de la enfermedad, el término **virulencia** cuantifica la magnitud del daño que el patógeno puede causar en los tejidos y en

³³ Relman DA, and Falkow S. *molecular perspective of microbial pathogenicity*. Cell, 103:19-29.

³⁴ Marrack P and Kappler J (1994) *Subversion of the immune system by pathogens*. Cell 76:323.

³⁵ Playfair AM (1993). *J Infection and immunity*. Oxford University Press.

³⁶ Romagnani S. (1997) *The Th1 / Th2 paradigm*. Immunol Today, 18:263-266.

los órganos del hospedador humano, así como la capacidad para invadir que posee el germen y la rapidez de multiplicarse; la facilidad de adherirse al epitelio superficial; la viabilidad de penetrar las distintas barreras y de dirigirse hacia los tejidos u órganos, por los cuales tiene mayores apetencias y condiciones para sobrevivir y reproducirse.

La virulencia de un microorganismo, es un término de valor relativo; muchos gérmenes cuyas virulencias habitualmente son bajas, pueden dar lugar a enfermedades graves en hospedadores con inmunidades deprimidas. Este es el caso de los **microorganismos oportunistas**:

Los microorganismos colonizan, proliferan, se multiplican, se replican y producen citotoxicidad directa. Las toxinas y las disgregaciones tisulares; destruyen los tejidos del individuo invadido, por los factores de virulencia que les son propios.

El tamaño de la **dosis infectante** del germen es un factor que es, muchas veces, decisivo para que la infección prospere. La penetración del microorganismo puede verse facilitada por la secreción de enzimas adecuados para ejercer esa función. El microorganismo también puede adherirse a un epitelio o a otro tejido.

Las **adhesinas microbianas**, moléculas que se fijan a los distintos receptores tisulares, pueden jugar un papel importante en la enfermedad. Estas moléculas, en las bacterias, están habitualmente situadas sobre estructuras filamentosas (fimbrias, pili), muestran afinidad por receptores específicos, como son los gangliósidos y glicoproteínas de superficie. En algunas cepas patógenas de *Escherichia coli* o de *Neisseria gonorrhoeae*, se ha demostrado que esos filamentos pilosos aumentan su virulencia y permiten a esos microorganismos la fácil unión a los uroepitelios, manteniéndolos allí a contracorriente de la orina, que no los puede arrastrar para eliminarlos. El **dextrano** producido por determinadas cepas de *Streptococcus viridans*, les permite adherirse a la superficie de los dientes, y provocan enfermedades en las encías. Los **polisacáridos capsulares** de algunas bacterias, pueden poseer propiedades análogas. Los complejos viscosos segregados por *Staphylococcus epidermidis*, frecuentemente se adhieren a las piezas protésicas, constituyéndose en fuentes de infecciones. El virus de la gripe se adhiere a los radicales del **ácido N-acetil neuramínico** de los epitelios respiratorios, mediante la proteína hemoaglutinante existente en la cubierta viral.

En la investigación de la patogenia de la infección por el **virus VIH**, se encontró que la penetración en la célula humana, se realizaba a través del receptor CD4 de los linfocitos Th *helper*, o de otras células que expresan este receptor, aunque con posterioridad se demostró que el virus podía utilizar además otros mecanismos de penetración a través de los **receptores Fc de inmunoglobulina**.

bulinas, o también de **receptores de complemento**. La molécula del glicoproteico gp120, entra en contacto con el receptor CD4 y facilita que la molécula gp41 se junte al factor de fusión de la membrana celular. A partir de aquí, se origina la introducción del **genoma viral**. Entonces, el agente patógeno puede pasar a una **fase de latencia**, o de **replicación** controlada o rápida. El descubrimiento del funcionamiento minucioso de los factores que intervienen en uno u otro de estos acontecimientos puede proporcionar la clave de la patogenia de la enfermedad. Se conoce algo sobre el estímulo antigénico y sobre algunos factores que van a influir en la **activación** del VIH, así como sobre las tres características fundamentales de alta **variabilidad genética** (errores cometidos por la polimerasa viral al incorporar los nucleótidos). El **tropismo**, el cambio de un único aminoácido en la molécula **gp120** de la envoltura, afectaría a la capacidad de unión al receptor CD4, pudiendo convertirlo en, al menos, **menos infeccioso**; también, otros cambios en la mencionada molécula de glicoproteína no afectarían a la unión al receptor, pero sí a su tropismo, que sólo podrá infectar a linfocitos, y no a monocitos, y virus defectuosos (partículas con genomas incompletos).

Los **retrovirus con genoma de DNA**, están integrados por una *transcriptasa inversa* y una *integrasa* dentro del genoma del hospedador humano, en donde pueden permanecer sin expresarse, en un periodo de latencia. La **latencia** es una forma muy eficaz para que el **virus escape** de la acción del sistema inmunitario, persistiendo su infecciosidad durante prolongados periodos de tiempo. Otros ejemplos lo constituyen el virus de Epstein-Barr (VEB) y los herpesvirus. Los linfocitos B infectados por el VEB, solamente expresan una proteína EBNA-1 que, en general, no son reconocidas, al menos, por los linfocitos citotóxicos de algunas personas. Parece que la repetición de la **secuencia Gly-Ala** de los aminoácidos de la mencionada proteína, emite **signos inhibidores** que interfieren con el procesamiento del antígeno y con la presentación del MHC-clase-I restringido³⁷.

La investigación y el desarrollo de una vacuna requiere establecer una **planificación** que comprenda la participación del mayor número posible de especialistas que aporten los **conocimientos específicos** aplicables al trabajo que se va a realizar. Exige la coordinación de esfuerzos que se inicien en el conocimiento preciso del proceso etiopatogénico, en la **biología molecular** del agente causal, así como en las características de las respuestas inmunitarias humoral y celular. Supone la realización de numerosos estudios preclínicos «in vitro» y en sistemas de **modelos animales** que más se asemejen —en síntomas, signos y respuesta inmunitaria— a la infección y a la enfermedad en humanos.

³⁷ Levitskaya J. Coram M, Levitsky V et al, 1995 Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the EBV nuclear antigen-1. *Nature* 375:685-687.

2.3. Gérmenes causantes de infecciones^{38, 39, 40}

VIRUS	INFECCIONES
Adenovirus	Infecciones respiratorias
Citomegalovirus	Mononucleosis
Coronavirus	Infecciones respiratorias y entéricas
Dengue	Fiebre de dengue, síndrome de choque
Epstein-Barr	Mononucleosis, linfoma de Burkitt
Fiebre amarilla	Ictericia, fallo renal y hepático
Hepatitis A, B, o C	Hepatitis
Herpes simplex tipo 1	Encefalitis, estomatitis
Herpes simplex tipo 2	Lesiones genitales
Herpes virus 6 (humano)	Desconocido, posiblemente sarcoma de Kaposi
Influenza A, B, y C	Infección respiratoria, gripe
Inmuno deficiencia humana tipos 1 y 2	Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
Papilomavirus	Verrugas, carcinoma cervical
Parotiditis, virus	Meningitis, encefalitis, parotiditis
Parvovirus	Infección respiratoria, anemia
Poliomavirus JC	Leucoencefalopatía multifocal
Poliomavirus BK	Cistitis hemorrágica
Poliomielitis	Parálisis
Rabia	Rabia, disfunción nerviosa
Respiratorio sincitial	Infección respiratoria
Rinovirus	Resfriado común
Rotavirus	Diarrea infantil
Rubéola	Exantema, malformaciones natales
Sarampión	Exantema, panencefalitis esclerosante subaguda
Sida (VIH)	Inm.def. humana adquirida
Varicela-zoster	Exantemática
<i>Vaccinia, virus</i>	Infección generalizada

³⁸ Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of infectious diseases, 4th Edition.

³⁹ A pubic-private handshake promises new vaccines for the world.-CIV.- (WHO), FORUM, Num.14, pg 9, June 1997.

⁴⁰ A global vaccine for a global disease.- An end to rotavirus diarrhea?.-CVI Forum, Num.14 pg 2; June,1997.

BACTERIAS	INFECCIONES
<i>Bacillus anthracis</i> (aerobio, forma esporas)	Antrax (carbunco cutáneo)
<i>Bordetella pertussis</i>	Tos ferina
<i>Borrelia burgdoferi</i> (espiroquetas de fiebres recurrentes)	Enfermedad de Lyme
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis
<i>Clostridium botulinicum</i>	Botulismo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria
<i>Escherichia coli</i>	Inf.intestinales (diarreas), y/o urinarias
<i>Haemophilus influenzae</i>	Otitis media, neumonía, meningitis
<i>Helicobacter pilori</i>	Gastritis, úlcera duodenal
<i>Legionella pneumophila</i>	Legionelosis, enfermedad del legionario
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sepsis, meningitis
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis, Tisis
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Infección urinaria, gonorrea
<i>Neisseria meningitidis</i> (meningococo)	Sepsis, meningitis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones hospitalarias
Rickettsia	Rickettsiosis, fiebre de las Montañas Rocosas
Salmonella	Gastroenteritis, fiebre tifoidea
<i>Shigella</i> (disenteriae, shigae, flexneri)	Disenteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	Impétigo, síndrome de choque tóxico
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Otitis media, neumonia
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Faringitis, fiebre reumática
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis, treponemasomiasis, espiroquetosis
<i>Treponema pertenue</i>	Pián, erupción en extremidades y regiones genitales
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubónica

PARÁSITOS	INFECCIONES
<i>Entamoeba histolytica</i>	Úlcera intestinal, Disenteria amebiana
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea entérica
Leishmania	Dolores tropicales, lesiones del bazo
Plasmodium	Paludismo, malaria
Microfilaria	Filariasis
Schistosoma	Esquistosomiasis
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vaginitis
<i>Tripanosoma africanum</i>	Tripanosomiasis
<i>Tripanosoma cruzi</i>	Enfermedad de Chagas
<i>Tripanosoma gambiense</i>	Enfermedad del sueño africano

HONGOS	INFECCIONES
<i>Candida albicans</i> (levadura patógena)	Candidiasis, infecciones de mucosas
<i>Dermatofitos comunes</i>	Invaden pelos y folículos pilosos
Histoplasma (dimórfico)	Histoplasmosis
<i>Pneumocystis carinii</i>	Neumonía (en enfermos de sida)
<i>Aspergillus fumigatis</i>	Aspergilosis

Nota: Los virus pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- I. Virus con genoma DNA,
- II. Virus con genoma RNA. Sin embargo, surgen algunos problemas para clasificar a los viroides, a los priones, a los virus híbridos, a los pseudoviriones y a los DNA-recombinantes⁴¹.

⁴¹ Dimmock NJ, and Pringle SB. (1994). Introduction to Modern Virology. Blackwell Science, Oxford.

CAPÍTULO III

3. INVESTIGACIONES SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y SUS RESPUESTAS

3.1. La inmunidad innata

La palabra inmunidad comprende a todos los mecanismos que el cuerpo utiliza para protegerse frente a los agentes del **ambiente** en que vive⁴².

Los invasores o **agentes extraños** al individuo pueden ser microorganismos, sus productos, polen, alimentos, medicamentos, sustancias químicas y **todo lo que se distingue de su propio ser** y se opone a su desarrollo normal.

La inmunidad es un proceso discriminatorio, que separa todo lo que no le es propio. «La complejidad funcional del sistema inmunitario es tan solo comparable a la correspondiente al sistema nervioso y, como este, aparece **disperso** e implantado en la **mayoría de los tejidos orgánicos**, siendo capaz de **memorizar** y de responder adecuadamente a una enorme variedad de señales específicas. Pueden recibir y transmitir **señales estimuladoras**, moduladoras e inhibidoras⁴³.

La comunicación entre estos dos sistemas tan fundamentales para la vida, parece que se pueda realizar a partir de **intercomunicadores celulares**, entre los cuales el **IFN- α** puede ser el primero que actúa en ambos de los sistemas mencionados.

⁴² Metchnikoff E. Lectures on the comparative pathology of inflammation. Keegan, Paul, Trench, Trubner, London (Reprinted by Dover, NY, 1968)

⁴³ Portolés A, Inmunofarmacología. Nuevos horizontes en **Biomedicina y Farmacoterapia**. 1986, pg.12.

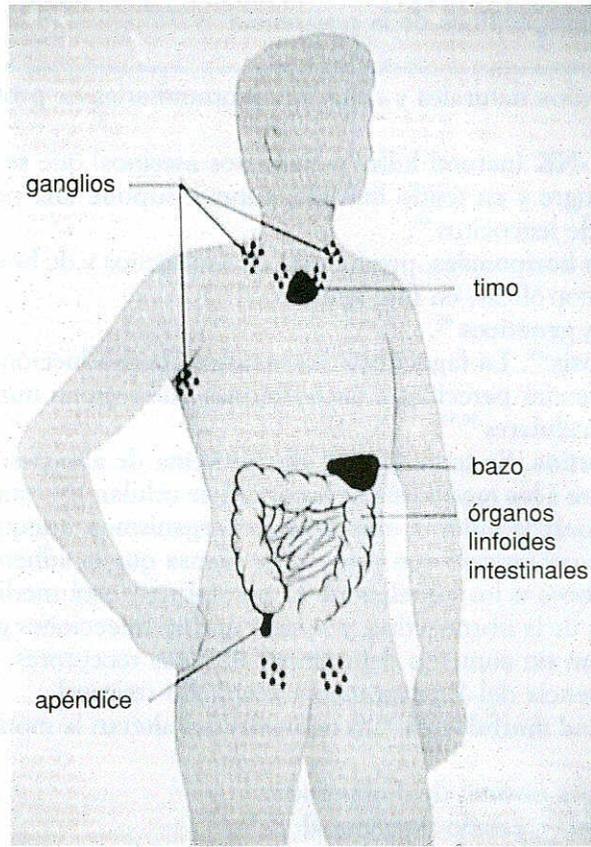
3.2. Mecanismos de defensa

3.2.1. *Las puertas de entrada de los agentes patógenos*

La mayoría de los organismos patógenos (protozoos, hongos, bacterias y virus), viven libremente en los suelos, **aguas** o materiales de deshechos, alimentándose de sustancias orgánicas en descomposición, y son lanzados al aire, por circunstancias atmosféricas o de otra naturaleza. La generalidad de los agentes patógenos, está adaptada para vivir sobre un solo tipo de hospedador. Consecuentemente, la **fuerza** más frecuente de infecciones humanas, son las propias **personas**. Los individuos afectados por una **enfermedad contagiosa**, pueden transmitirla con mayor facilidad a otras personas. La transmisión podría efectuarse en las primeras etapas del desarrollo de la infección en el infectante, y antes de que se le manifieste ningún signo ni síntoma, o una vez que la enfermedad se ha declarado abiertamente, o incluso durante la convalecencia.

El cuerpo humano posee unas **estructuras tisulares específicas**, muchas veces protegidas por barreras, que le sirven para relacionarse con el exterior y poder realizar sus funciones vitales. Los patógenos utilizan estas zonas anatómicas como puertas de acceso para entrar en las distintas partes del hospedador. Además de estas vías de entrada permanentemente abiertas, aunque defendidas por obstáculos físicos, químicos, y biológicos, el organismo humano sufre, circunstancialmente, alteraciones de la **integridad corporal**. Las heridas accidentales, picaduras de insectos, mordeduras de animales, proporcionan oportunidades evidentes para la infección por inoculación. Los instrumentos quirúrgicos contaminados, las agujas hipodérmicas, las jeringuillas y las soluciones inyectables, pueden también facilitar la entrada de los patógenos. Es el caso frecuente de las transmisiones de las **enfermedades sexuales**, aunque estas infecciones podrían ser ocasionadas porque los líquidos biológicos contagiados, frecuentemente son **vehículos contagiosos** para las personas sanas. Numerosas infecciones de las vías respiratorias se contraen a través de la inhalación de gotículas de secreciones presentes en el aire, y procedentes de estornudos o toses de infectados. Los gérmenes provenientes de materias fecales y de materiales contaminados, pueden ser ingeridos por contacto directo o indirecto entre boca y **manos sucias**, además de por las aguas o por los **alimentos contaminados**.

Algunas infecciones pueden ser transmitidas verticalmente por contagio de la madre gestante al feto; por ejemplo, por los virus de la rubéola (puede ocasionar **malformaciones graves**), de la hepatitis B (puede ser ocasión de que se convierta en un portador crónico de este virus, con la trascendencia que le supondría), por la bacteria *Clostridium tetani* (que podría ocasionar un tétanos neonatal, extraordinariamente grave).



3.2.2. Barreras que protegen frente a la infección

Es importante considerar los mecanismos desplegados por el hospedador en su defensa, con el fin de poder conocer de qué medios dispone y la forma como establece la lucha frente al **agente infeccioso**.

Aunque el **ambiente** en que se desarrolla la vida humana está rodeado de organismos potencialmente patógenos entre los cuales son frecuentes los gérmenes infecciosos, el sistema de **barreras de defensa** evita que se sufran enfermedades de una forma permanente. Aún más, los gérmenes patógenos pueden invadir y multiplicarse en el cuerpo humano, sin provocar una infección que llegue a ser enfermedad, porque el sistema defensivo e inmunitario, generalmente está en condiciones de evitar el acceso a los tejidos corporales y órganos en donde podrían causar daños.

3.3. Factores inespecíficos de la resistencia

- 1.—**Anticuerpos naturales** y situaciones inmunitarias de protección cruzada^{44,45}.
- 2.—**Células -NK** (natural killer o linfocitos asesinos), que se encuentran en la sangre y en tejido linfoide, aunque supone una población reducida de leucocitos⁴⁶.
- 3.—**Factores hormonales**, producción de estrógenos y de hormona adrenocorticotrófica, en fase aguda⁴⁷.
- 4.—**Factores genéticos**⁴⁸.
- 5.—**Fagocitosis**⁴⁹. La fagocitosis desencadena la producción de citoquinas, sustancias parecidas a las hormonas que regulan numerosas respuestas celulares^{50,51}.
- 6.—**Fibronectina**. Se trata de una glicoproteína de alto peso molecular, que cubre a los receptores de la superficie celular. De esta forma puede bloquear la unión a muchos microorganismos, aunque puede facilitar la conjunción con otros⁵². Se piensa que la adherencia de los neumococos a los epitelios de la nasofaringe, está mediada por receptores de la fibronectina, y se sabe que las infecciones gripales proporcionan un aumento del número de estos receptores, y favorecen la adherencia del *S. pneumoniae* al epitelio traqueal.
- 7.—**Integridad morfológica**. Las neumolisinas alteran la motilidad de los cilios.
- 8.—**Microflora normal del hospedador**.
- 9.—**Nutrición, o estado nutricional. Edad**⁵³.
- 10.—**Respuesta inmunitaria no-específica**.
- 11.—**Excreciones normales y secreciones internas**.

⁴⁴ Schneerson R, Robbins JB. (1995) Induction of serum haemophilus influenzae type b capsular in adults volunteers fed cross reacting *Escherichia coli*-075, k-100:45. *N Engl J Med*. 272:1093.

⁴⁵ Griffiss JM (1975) Bactericidal activity by IgA of lytic antibody in human convalescent sera. *J Immunol* 114: 179.

⁴⁶ Tatenka J, Cebra JJ, Rubin DH. (1995) *Characterization of cytotoxic cells from reovirus-infected SCID mice: activated cells express natural killer and lymphokine-activated killer-like activity, but fail to clear infection*. *J Virol* 69: 3910.

⁴⁷ Weinberg DE. (1984) Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis* 6: 814-31.

⁴⁸ Zander H, Gross-Wilder H, Kuntz B, et al. (1979), *HLA-A, -B, and -D antigens in paralytic poliomyelitis*. *Tissue Antigens*. 13: 310.

⁴⁹ Sullivan GW, Mandell GL, The role of cytokines in infection. (1991) *Curr Opin Infect Dis*.4: 344-49.

⁵⁰ Romagnani S. (1992) *Induction of Th₁ and Th₂ responses: a key role for the natural immune response?* *Immunol Today* 13: 379-391.

⁵¹ Minty A, Chalon P, Derocq JM, et al. (1993) *Interleukine-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. *Nature* 362:148-150.

⁵² Vandaux P, Didier P, Haerberli A, et al.(1993) *Fibronectin is more active than fibrin and fibrinogen in promoting S. aureus adherence to inserted intravascular catheters*. *J Infect Dis*. 167:633-41.

⁵³ Powers DC, Belshe RB (1991). *Effect of age in cytotoxic lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine*. *J Infect Dis*.167: 584-592.

3.3.1. *Las funciones de la piel y de las mucosas en la defensa frente a la infección*

La piel constituye una barrera física impermeable a la mayoría de los microorganismos. La **acidez** que proporciona al medio, y los enzimas que contienen las secreciones de las glándulas sebáceas y sudoríparas de la piel, moléculas con acciones antibióticas como las **beta-defensinas-2**⁵⁴, en su conjunto, son capaces de matar a numerosos microorganismos patógenos. El epitelio de la piel posee dos características inmunológicas: la presencia de un tipo de **células dendríticas**, las células de **Langerhans**, y los llamados **linfocitos intraepiteliales**; esta clase de linfocitos T, posee cadenas de receptores gamma y delta, a diferencia de las cadenas de receptores alfa y beta de la mayor parte de las otras células. La función de las células de Langerhans es la de recoger y transportar hacia el nódulo linfoide de drenaje todo el material extraño. En el nódulo se inicia la respuesta inmunitaria.

Las superficies internas del cuerpo, están protegidas por **membranas mucosas** que tienen la facultad de atrapar numerosas partículas extrañas. El **mucus secretado** por las mucosas contiene, como las secreciones de la piel, sustancias químicas con propiedades germicidas. Los líquidos que bañan las superficies de las mucosas, contienen IgA, un isotipo de inmunoglobulinas producidas por un numeroso grupo de **linfocitos B activados**. Estas moléculas de IgA cooperan con los otros mecanismos de inmunidad innata que funcionan a nivel de las mucosas. Evitan que los microorganismos invadan el cuerpo y neutralizan sus toxinas. Este proceso de exclusión, normalmente, no desencadena ninguna **inflamación**, pues no supone unión a complemento; la inflamación en estos vastos territorios tisulares, puede perjudicar mucho, dado el volumen de materiales antigénicos que en ellos se contiene. La IgA puede también potenciar los efectos antibacterianos de la **lactoferrina** y de la **lactoperoxidasa**⁵⁵. Se ha demostrado la presencia de linfocitos T citotóxicos en la mucosa vaginal de los monos infectados por el **VIS** (virus de la inmunodeficiencia en simios), y esto constituye un dato más a favor de llegar a poder vacunar mucosas y epitelios⁵⁶. Se está trabajando mucho en este campo de **investigación inmunológica**, pero es evidente que aún se necesita avanzar mucho más para, a **través de la vacunación**, optimar la multiplicación y la **activación** de las poblaciones de **linfocitos T que protejan las mucosas**.

Las vías respiratorias, así mismo, están protegidas por mucosas que barren, filtran, atrapan en el mucus y eliminan numerosos microorganismos que se en-

⁵⁴ (1997) Nature, 387:908-909

⁵⁵ (Kilian M, Mestecky J, Russell MW. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent function of immunoglobulin A and their subversion by immunoglobulin A proteases. Microbiol Rev 52:225-231).

⁵⁶ Lohman BL, Miller CJ, Mcchesney MB, 1995 Antiviral cytotoxic T lymphocytes in the vaginal mucosa of simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. J Immunol 155:5855 - 5861).

cuentran en el aire inspirado. El mucus con los cuerpos atrapados son impulsados a través de la garganta por los **cilios** que recubren la superficie interna del conducto.

Los gérmenes deglutidos por el aparato digestivo son, generalmente, destruidos por los potentes ácidos de los **jugos gástricos**. Los que pudieran sobrevivir, serán posteriormente atacados por las sustancias alcalinas y los **enzimas del intestino delgado**. Así mismo, la **flora bacteriana intestinal** actúa como mecanismo de defensa, limitando e inhibiendo la proliferación de microorganismos nocivos.

Para el caso de que el agente patógeno logre franquear las barreras protectoras y penetrar en el cuerpo, se ponen en funcionamiento otros mecanismos adicionales de **defensa inespecífica**. El sistema inmunitario humano moviliza dos líneas importantes de defensa: la **inmunidad natural o innata**, que proporciona una respuesta rápida e inespecífica, y la **inmunidad adquirida o inducida**, cuya respuesta aparece más tarde, unos 3 a 5 días siguientes a la infección.

3.4. Respuesta inmunitaria

Todas las respuestas inmunitarias se inician por el reconocimiento de los gérmenes o partículas extrañas que ingresan en el individuo. A continuación, sigue la fase de **activación** de los linfocitos que específicamente reconocen al correspondiente **antígeno**, y finaliza con la **fase efectora**, para eliminar al elemento extraño.

La inmunidad natural o **innata** es la responsable de originar la respuesta inicial del cuerpo ante una infección. Se pone en marcha tan pronto como el germen invade los tejidos, en prevención de que pueda ocasionar daños en ellos. Es **inespecífica**. No se aumenta ni disminuye cuando el germen se vuelve a poner en contacto en otra ocasión con el hospedador. No genera memoria. Se manifiesta por la inmediata producción de numerosos mediadores de **inflamación**. El principal iniciador de la **respuesta inflamatoria** es la **citoquina TNF α** , (que incrementa el diámetro y la permeabilidad vascular; también estimula la expresión de algunas moléculas de adherencia en el endotelio; la citoquina **IL-8** origina la atracción de los neutrófilos y de los linfocitos T, favoreciendo su llegada a la zona de infección. Los tres acontecimientos más importantes que ocurren durante esta respuesta inflamatoria son: a) **Aumento de la afluencia de sangre a la zona infectada**; b) **Incremento de la permeabilidad vascular**, que facilita que las moléculas y partículas de mayores dimensiones, puedan atravesar el endotelio, y segregar en el sitio de la infección, los **mediadores solubles** de la inmunidad. c) **Los leucocitos**, especialmente los **neutrófilos** polinucleares, y los **macrófagos** en menor extensión, **se salen de los capilares e inmigran hacia los tejidos que les rodean**.



Médula ósea

Por un proceso de quimiotaxis, son atraídos hacia el sitio de la infección.

Dos componentes toman parte activa en esta respuesta: **factores solubles**, tales como los **interferones** que se producen en una gran variedad de células y se van a unir y a afectar el comportamiento de las otras células, y la **cascada de complementos**. El sistema de complementos es un grupo de unas treinta o cuarenta moléculas de proteínas plasmáticas, cuya concentración aumenta entre dos y unas cien veces la cifra inicial, durante la infección. Su principal función está en controlar la inflamación. La fiebre que generalmente se encuentra en todas las infecciones agudas, está producida por las **citoquinas pirogénicas** (citoquinas tales como la **IL-1** y la **IL-6**; **interferones**, el **factor de necrosis tumoral** α , **TNF- α** , y las **prostaglandinas**, son factores pirogénicos endógenos; las **endotoxinas** polisacáridos de las bacterias gram-negativas; **productos de necrosis** de tejidos: algunas **exotoxinas** como las del *Staphylococcus aureus*; los complejos moleculares de antígeno-anticuerpo, constituyen con otras moléculas, el grupo de sustancias **pirogénicas exógenas**).

En los humanos, la fiebre corresponde a una respuesta beneficiosa frente a la infección. Durante la fase de **inflamación** local aguda, producida por varios agentes infecciosos, puede originarse la activación del sistema clásico de complementos, en ausencia de anticuerpos: aumentan rápidamente las concentraciones de determinadas proteínas plasmáticas en la llamada **respuesta de fase aguda**. Aparece **proteína-C reactiva**, que forma complejos con los polisacáridos capsulares de bacterias y parásitos, etc.

Cuando un microorganismo penetra la superficie epitelial, se encuentra con las células fagocitarias del linaje de **monocito/macrófago**. Estas células son de varios y de diferentes tipos, pero todos provienen de la **médula**. Engullen cualquier clase de partícula, incluidos los agentes infecciosos que se encuentre a su paso. Los fagocitan, y los destruyen.

Para este fin, están colocados estratégicamente en los sitios de máxima posibilidad de encuentro; por ejemplo, en las **células de Kupffer** del hígado, en los alvéolos pulmonares, nódulos linfáticos, corriente sanguínea, fagocitos sanguíneos, etc. Las células "**Natural Killer**" son leucocitos que reconocen los cambios de la superficie de las **células infectadas**, o afectadas por un proceso tumoral, se adhieren a ellas, las inactivan y las matan.

La **lisozima** es un **enzima** capaz de destruir la pared celular de algunas bacterias. Se origina en las glándulas salivares, el tejido lacrimal, las membranas mucosas de los conductos respiratorio y digestivo, el bazo, los nódulos linfáticos y en ciertos tejidos celulares especializados como son los **macrófagos**.

3.5. La fagocitosis

La fagocitosis consiste en la ingestión e inclusión dentro del citoplasma de los macrófagos o de los neutrófilos de los microorganismos que se han introducido en el cuerpo. Se forma así un **fagosoma**, que se funde con el **organelo citoplasmático**, y forma el **lisosoma**. Los lisosomas contienen numerosos **enzimas degradativos**, tales como **lisozima, nucleasas, fosfatasas, coleagenasa y elastasa**, etc. Según Unanue⁵⁷, los macrófagos segregan los siguientes productos: Proteínas implicadas en la **inflamación** y en la defensa tales como los **complementos proteicos C2, C3, C4 y C5**, la lisozima y la fibronectina. Los factores de regulación, diferenciación y de crecimiento: **G-CSF (factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos)**, **M-CSF** (factores estimuladores de colonias de monocitos), **GM-CSF** (factores estimulantes de colonias de granulocitos y de macrófagos); citoquinas, que regulan las respuestas linfocitarias: como las **IL1, IL6, IL8, IL10, IL12**, y el agonista del **receptor IL-1**; y finalmente, los factores que promueven la reparación de los tejidos dañados: factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y factor de crecimiento de los fibroblastos.

Los macrófagos poseen otro mecanismo para la destrucción del artefacto de residuos fagocitados: se basa en el **óxido nítrico**, tóxico que se origina por la acción de la **óxido-nítrico-sintetasa** que actúa sobre la arginina.

⁵⁷ Unanue, (1993), en Paul WE, «Fundamental Immunology», 3a ed de. 1993, Raven Press, Nueva York, pg III-144).

La liberación de los restos degradados fagocitosomiales desde los fagocitos, son señales de alerta que aumentan los fenómenos de quimiotaxis, y la respuesta inflamatoria. Esta respuesta se amplifica posteriormente por los **macrófagos** activados y, durante la respuesta adaptativa, por los linfocitos antigénicamente estimulados, a través de la liberación de **mediadores químicos**, lo que supone una **unión importante entre la inmunidad innata o natural, y la inmunidad inducida.**

3.6. Algunas de la funciones del interferon-gamma

La función principal de la **citoquina** denominada interferón- γ , IFN- γ , consiste en la **inmunomodulación** (de 100 a 10.000 veces más activa que el IFN- α , o que IFN- β), y en aumentar la expresión antigénica en el MHC-I y el MHC-II en las células que normalmente no lo expresan. La mayor parte de las células tienen receptores para el IFN- γ , pero su objetivo prioritario está en el linaje de células de los macrófagos, en los cuales estimula variadas actuaciones. Por ejemplo: a) Promociona la diferenciación de los **precursores mieloides inmaduros**, para transformarlos en monocitos maduros; b) Estimula la capacidad, como **células presentadoras de antígenos** de los macrófagos, mediante la regulación de la expresión del MHC-I, y la ampliación de la transcripción de algunas moléculas auxiliares, como son las **proteasas** y los transportadores peptídicos, que son los responsables del **procesado del antígeno**; c) Promueve la expresión de otros antígenos de superficie celular, tales como los ICAMS (moléculas de adhesión intercelular), que toman parte en las interacciones entre los macrófagos y los linfocitos T; d) Mediante la producción de moléculas tales como oxígeno-reactivo e intermediarios nitrogenados y del TNF- α , estimulan la **actividad citolítica** no-específica, frente a muchos parásitos, intra y extracelulares, y hacia **células neoplásicas**; e) Promueve la resistencia de los macrófagos.

En **experimentación animal** se ha demostrado que el IFN- γ **disminuye** la producción y la secreción de **IgG1 , IgG2b, IgG3 e IgE.**

3.7. Leucocitos

Los leucocitos más abundantes en la sangre (diariamente se producen unos 10 billones); son los neutrófilos, conocidos también como granulocitos o leucocitos polimorfonucleares.

Aproximadamente el 50% de las células originadas en la **médula ósea** son neutrófilos y sus precursores. Su vida media está comprendida entre 6 y 10 horas. Constituyen la **vanguardia de las defensas** del organismo humano, especialmente frente a las infecciones bacterianas y fúngicas. Aparecen en unos **pocos minutos en el foco** infeccioso, mientras que los **macrófagos** tardan unas horas.

Los «*natural killers*» (**leucocitos NK**) representan a una pequeña población de leucocitos que se encuentra repartida en la sangre y en los tejidos linfoides periféricos. Segregan IFN- γ , por **estímulo** de la interleukina-1, **IL-1**, y **del factor de necrosis tumoral α** , TNF- α . La citotoxicidad de los leucocitos-NK, se ve aumentada por las acciones de la IL-1, el TNF- α y el IFN- γ . La función principal de los leucocitos-NK consiste en inactivar o matar a determinadas **células tumorales**, así como a las **células infectadas** por virus, respetando discriminadamente a las células normales homólogas, pero enfrentándose a las procedentes de transplantes. De forma diferencial, destruye también a las células que expresan débilmente a los marcadores de antígenos procesados por el MHC-de clase I⁵⁸.

Todo el linaje de células de monocitos y de **macrófagos**, desempeñan un papel fundamental en el sistema defensivo frente a la infección. Los macrófagos, indudablemente, se responsabilizan de su función desde el mismo momento de responder a la presencia del germen, hasta su total destrucción y desaparición de todos sus restos, actuando entonces como **células presentadoras del antígeno**. Los monocitos y los macrófagos se pueden activar rápidamente por acción del IL-1, del TNF- α , o del IFN- γ ⁵⁹.

Resumiendo, en la inmunidad natural o innata, actúan una serie de moléculas importantes: citoquinas de macrófagos, **proteínas de fase aguda** como son los **complementos** e **interferones**, y un grupo de células, fagocitos de las series de **monocitos/macrófagos**, y **leucocitos «natural killer»**.

⁵⁸ Afonso LCC, Sharrton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G and Scott P. (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*,263:235-237.

⁵⁹ Engelhard VH. (1994). Structure of peptides associated with class I and class II MHC. *Ann Rev Immunol.*, 12:181.

CAPÍTULO IV

4. INVESTIGACIONES SOBRE LA INMUNIDAD ESPECÍFICA O ADQUIRIDA

Se presentan problemas cuando los fagocitos son incapaces de reconocer al agente infeccioso, bien sea porque les falta un receptor para ello, o porque el germen no llega a activar el sistema de complementos. Entonces, por dificultades de acercamiento, a través del receptor C3b, no se produce la **fagocitosis**. Imaginativamente, todo se resolvería disponiendo de un adaptador flexible que, por un extremo se uniera al microorganismo, y por el otro al fagocito⁶⁰.

El sistema inmunitario humano produce varios millones de **anticuerpos**, o de moléculas con **series de numerosas formas** capaces de reconocer una amplia variedad de superficies marcadoras de distintos agentes patógenos, como respuesta inmunitaria humoral. Estos anticuerpos, producidos por las células plasmáticas linfoides estimuladas por citoquinas, captan, se adhieren con especificidad y se unen al receptor de una bacteria, o de una partícula viral, para inmovilizarlas, **neutralizar sus efectos patógenos** y prepararlas para que sean destruidas, promueven la **fagocitosis por opsonización**, y activan la actuación del complemento⁶¹.

Paradójicamente, en alguna circunstancia especial, podría ocurrir que un alto nivel de anticuerpos condujera a una **ausencia de respuesta inmunitaria**, probablemente debido a **bloqueo periférico** de la cobertura de los **receptores antigénicos** a nivel aferente de **células citotóxicas**⁶². Se sabe desde la antigüedad, que los individuos que sobreviven a ciertas enfermedades infecciosas, no son propensos a contraerlas nuevamente. Han adquirido inmunidad⁶³. Tres propiedades importantes caracterizan a la respuesta inmunitaria adaptativa o

⁶⁰ Clark EA, Ledbetter JA (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature*, 367:425.

⁶¹ Hamblin AS. (1993) *Cytokines and Cytokines Receptors*. IRL Press, Oxford.

⁶² Kaliss N, (1958). Immunological enhancement of tumor homograft in mice-A review. *Cancer res*, 18: 992-1003

⁶³ Plotkin SL, Plotkin SA. (1994) *A short history of vaccination*. En Plotkin SA, Mortimer EA, eds. *Vaccines*, 2nd de. Saunder WB, Philadelphia, pg.1-12.

adquirida: **especificidad, selectividad y memoria**. La respuesta inmunitaria es específica, pues los anticuerpos circulantes reconocen las formas o conformaciones de las moléculas marcadoras de los antígenos, y en la respuesta inmunitaria celular los linfocitos especializados detectan las estructuras primarias. Es **selectiva** porque distingue entre los componentes del huésped y los del hospedador. Además **guarda memoria** del primer contacto con el antígeno, y en el futuro, en caso de nuevo contacto, marcará su presencia.

4.1. Investigaciones sobre los linfocitos responsables de la respuesta de inmunidad adquirida

Los responsables sanguíneos de la respuesta inmunitaria adquirida son los **linfocitos mononucleares**. Los linfocitos se originan en la médula ósea, algunos de ellos emigran hacia el timo antes de llegar a madurar; en este órgano, son procesados, consiguen el grado de madurez adecuado y son lanzados al torrente sanguíneo. Son los linfocitos T los que se responsabilizan de la inmunidad celular, o respuesta inmunitaria mediada por células. Los linfocitos T disponen de un **receptor de membrana** (TCR), identificador de antígenos, que es muy específico.

Se trata de estructuras análogas a las **inmunoglobulinas**. Los **linfocitos Tc (citotóxicos)**, mayoritariamente expresan la estructura molecular CDB, mientras que los cooperadores o «helpers (Th)», tipos Th₁ y Th₂, segregan IL-3, TNF- α y factor estimulante de formación de colonias de granulocito/macrófago (GM-CSF). Se derivan del precursor común Thp, a través de la población de linfocitos Th₀, que expresan grupos variables de citoquinas. Algunas de las funciones diferenciadoras de los linfocitos Th₁ y Th₂⁶⁴, respectivamente, se pueden deducir de los diferentes efectos originados por las citoquinas que producen. Los linfocitos Th₁, generalmente expresan **estructuras moleculares de CD4**. Los linfocitos Th₁-CD4⁺ activados, segregan IL-2, diferenciándose en Th1 (formados por el estímulo del IFN- γ y la IL-12), en que modulan la respuesta inmunitaria celular a través de la síntesis de IL-2, IFN- γ y TNF- **betalinfotoxina**, dando lugar a linfocitos T-CD8⁺, y a linfocitos T-citotóxicos. Por otra parte, los linfocitos Th₂ son los responsables de la **regulación** y coordinación de la respuesta inmunitaria humoral, a través de la síntesis de las IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13, dando lugar a la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. El resto de los linfocitos que permanecen en la médula, y que son procesados y maduran allí, son también linfocitos B, que participan en la respuesta inmunitaria humoral, o respuesta mediada por anticuerpos. Su función principal consiste en producir moléculas de inmunoglobulinas (Ig), de los cinco isotipos principales (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE). Los linfocitos B circulantes en el to-

⁶⁴ Prete G. and Romagnani S. (1994). Ability of HIV to promote a Th₁ to Th₀ cells. Science, 265:244

rrente sanguíneo, llevan expresados en sus respectivas membranas plamáticas, las IgM e IgD que producen y vierten a la sangre y a los espacios extracelulares. Generalmente, están en la médula ósea, el bazo y los distintos ganglios linfáticos.

La respuesta de los linfocitos B frente a la mayoría de los antígenos, está dirigida por linfocitos T, mediante la actuación equilibradora de los linfocitos T cooperadores (Th), y los linfocitos T supresores, que producen factores de Tausing y Tada⁶⁵. La integración de los distintos elementos, y las complejidades de los fenómenos que se originan, como consecuencia de las interacciones celulares-moleculares de los fenómenos, de la regulación inmunitaria, es objeto de estudios y de investigaciones de magnitudes inagotables.

Un gran número de los distintos tipos de **linfocitos circulan** por el torrente circulatorio sanguíneo (un millón de millones de linfocitos), pasando por el interior de los **nódulos linfáticos**, los vasos linfáticos, se introducen en otros tejidos linfoides, atraviesan el bazo, y continuamente están circulando y reciclando, drenando los tejidos corporales, y buscando el contacto rápido con los antígenos, en cuanto estos ingresan en el cuerpo.

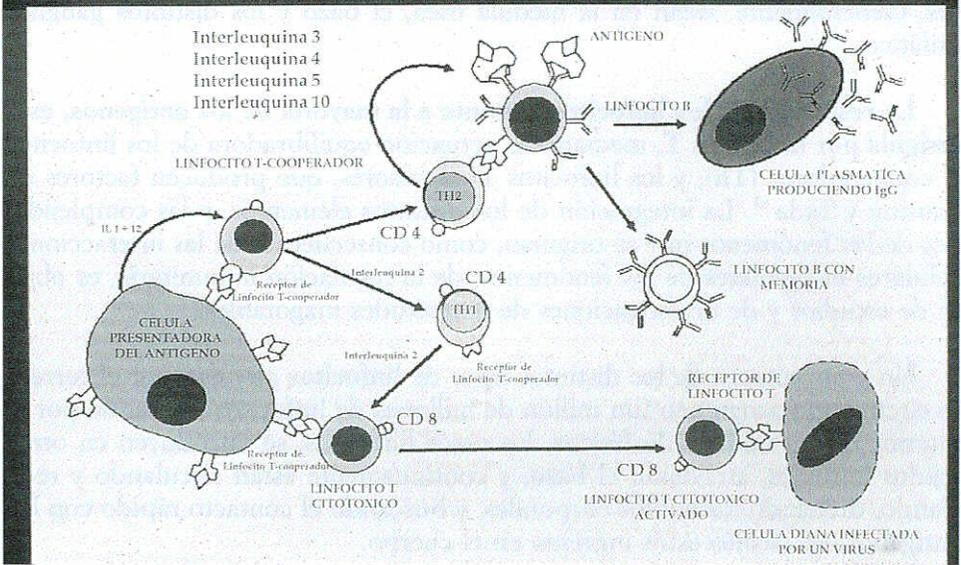
Los linfocitos reaccionan frente a los antígenos, siempre que esos antígenos hayan sido procesados, y las estructuras de ese procesado, sean presentadas por los **complejos de histocompatibilidad de los macrófagos u otras células**. Cuando el marcador del antígeno se combina con el receptor, se estimula su reproducción, formándose verdaderas colonias de un **clono** de descendientes. Cada clono es idéntico a la célula original (la misma especificidad y selectividad). Cuando la célula original es un linfocito T, las células de la colonia neutralizan al antígeno por respuesta inmunitaria mediada por células, pero si se trata de un linfocito B, se desencadena una respuesta inmunitaria a través de anticuerpos. En uno y en otro caso, otras células de las colonias respectivas, desarrollarán una reacción amnésica o de memoria, que protegerán al cuerpo frente a una repetición de contacto futuro con el mismo germen.

4.2. Investigaciones sobre los complejos moleculares principales de histocompatibilidad

Un complejo principal de histocompatibilidad es una región de **genes** altamente **polimórficos**, cuyos productos se expresan sobre las superficies de una gran variedad de células, como moléculas proteicas, denominadas **moléculas MHC**.

⁶⁵ Tausing, MJ, Munro, AJ y Luzzati, AL. I-region gene products in cell cooperation.- The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune response. De Katz, DH and Benacerraf, B. Acad Press, 1976, NY.

INMUNIDAD CELULAR INDUCIDA POR VACUNAS



En su origen se reconoció por su gran influencia en los rechazos en los trasplantes de órganos. Posteriormente, se dedicó gran atención a su estudio, y ahora se sabe que las moléculas codificadas tienen la función de reconocer a las moléculas de los antígenos o **epítomos**, adicionalmente a las funciones de los receptores específicos de los linfocitos B y de los linfocitos T.

El sistema MHC constituye el mecanismo predominante del propio reconocimiento y mantiene la defensa inmunitaria frente a todo lo extraño al propio individuo. En este aspecto, son responsables también, de la defensa contra la **enfermedad infecciosa**, de la **vigilancia antitumoral**, y de otras interacciones posibles, como sucede en la viviparidad⁶⁶, la madre distingue que se trata de un nuevo individuo al que ella está dando el ser, y no de un injerto convencional».

Los genes de la respuesta inmunitaria, controlan la **activación** de los linfocitos Th necesarios para que se desencadenen los fenómenos correspondientes a las acciones de las defensas.

A finales de la década de los años 70, un grupo de investigadores⁶⁷, demostró que los **linfocitos T antígeno-específico**, no reconocen a estos **inmu-**

⁶⁶ Portolés A. (1986). Inmunofarmacología. Nuevos horizontes en Biomedicina y Farmacoterapia. pg 38-48.

⁶⁷ Benoist, C y Mathis, D. «Regulation of MHC class II; genes X, Y and other letters of the alphabet. Annual Review of immunology, 8: 681-715, 1990).

nógenos en sus formas libres ni solubles. Solamente les indentifican cuando han sido previamente procesados, y algunas de sus porciones proteicas, **unidas no-covalentemente**, a las **moléculas del MHC** de una o otra clase (clase I o clase II), y mostradas sobre las superficies de las membranas celulares. Además, en cada individuo, los receptores de los linfocitos T maduros para los antígenos proteicos extraños, son específicos para **formar complejos con las moléculas de los MHC** correspondientes. Las moléculas de los MHC se constituyen en componentes integrales de los **ligandos** que el linfocito T puede identificar.

En contraste con los **anticuerpos**, que funcionan en la misma circulación sanguínea, captando y uniéndose a los antígenos solubles para neutralizar sus acciones patógenas de forma directa, los linfocitos T únicamente pueden reconocer a los **antígenos extraños**, cuando se adhieren físicamente a las superficies de las **células presentadoras**. Las moléculas del MHC son formaciones **asociadas y fijadas a la membrana celular** y no se encuentran libres ni se segregan.

Indudablemente, este hecho limita la activación de estos linfocitos T, que sin embargo, interactúan con la mayor efectividad con las células que llevan en sus membranas celulares, moléculas del MHC que realizan la función de presentar al antígeno. El reconocimiento del mencionado inmunógeno sobre la superficie celular, sirve también para localizar las funciones efectoras del linfocito T activado al sitio anatómico en que se ha detectado.

Los **modelos de asociación del antígeno** con las moléculas de los MHC de las clases I y de la clase II determinan los tipos de linfocitos que son estimulados por las diferentes formas estructurales. Generalmente, los fragmentos proteicos de las **proteínas extracelulares** se unen a las moléculas del MHC clase II, mientras que los péptidos sintetizados por vía endógena, se asocian a las moléculas del MHC de la clase I. Por esta razón, las proteínas sintetizadas por vía exógena y endógena, en su mayoría son reconocidas por poblaciones de linfocitos T que funcionalmente son distintos.

La respuesta inmunitaria a una **proteína extraña** está condicionada a la presencia, o a la ausencia, de moléculas del MHC que puedan unirse y presentar fragmentos de esa proteína a los linfocitos T. Como se ha establecido en varias ocasiones, los genes del MHC son muy polimórficos; existen numerosos **alelos** diferentes dentro de su población, y esas diferencias se traducen en sus distintas capacidades de unirse, y de presentar diversos determinantes antigénicos. Este es uno de los caminos a través de los cuales los genes del MHC controlan la respuesta frente a los antígenos proteicos.

En cualquier individuo, los linfocitos T maduros reconocen y responden a los **antígenos peptídicos** extraños, pero no responden, como es natural, a los estímulos de las proteínas propias de la misma persona.

El programa de reconocimiento del antígeno está en la conformación estructural de los linfocitos T específicos para el antígeno extraño desde el mismo momento de su desarrollo. Se basa en la capacidad de reconocimiento de las moléculas propias del MHC, con o sin la necesidad de que estén unidos a los antígenos peptídicos. Por eso se puede considerar que una segunda vía para que los genes del MHC puedan influir en las respuestas inmunitarias a un antígeno particular es a través del papel que desempeñan las moléculas del MHC en darle formas determinadas a la programación de la actuación de los linfocitos T maduros.

4.2.1. *Investigaciones sobre las estructuras de las moléculas de los MHC*

Desde el momento en que se descubrió la importancia del papel que las moléculas del MHC desempeñan en el reconocimiento de los antígenos proteícos por los linfocitos T, se desplegaron grandes esfuerzos de investigación para descubrir las posibles estructuras de esas moléculas⁶⁸. Sobre las bases estructurales encontradas, se sabe que:

- a) La naturaleza de la unión del MHC con los antígenos peptídicos extraños, y la contribución que el **polimorfismo genético** de las moléculas del MHC presta a la especificidad de la unión peptídica mencionada.
- b) Los distintivos diferenciales de las estructuras de las moléculas del MHC de la clase, que sirven de base a la especificidad de los linfocitos T.CD8+, y cuáles son los que explican el mismo fenómeno en los linfocitos T.CD4+, para las moléculas del MHC de la clase II.

4.2.2. *Las moléculas del MHC de la clase I*

Las moléculas del MHC de la clase I se disponen en cuatro regiones separadas virtualmente entre sí. Dichas regiones son las siguientes:

- a) La región de unión a los péptidos extraños con un N-aminoácido terminal, que tapiza la **superficie extracelular** de la membrana;
- b) Una zona o región **extracelular** con semejanza a las inmunoglobulinas;
- c) Una región **transmembranal** de separación;
- d) La **zona citoplasmática**.

⁶⁸ Strominger, J.L., Engelhard, V.H., Fuk, A. Guild, B.C., y otros, Biochemical analysis of products of the MHC, en M-E- Dorf editor. The role of the MHC in immunology, Garland STPM Press, New York, 1981, pg 11 7-172.

El conjunto de las moléculas del MHC de la clase I, está formado por dos cadenas **polipeptídicas**: a) Una **cadena pesada** (cadena α), de unos 44 kilodaltones (kD), y b) una cadena ligera (cadena β), de 12 kD. La cadena α está formada por núcleo o «**core**» polipeptídico, con un N-unido a un polisacárido de unos 40 kD. Cada cadena α se orienta de forma que, unas tres cuartas partes del polipéptido conteniendo el aminoácido terminal, y el grupo oligosacárido, se extiendan y tapicen parte de la superficie externa de la membrana extracelular. Un segmento corto e hidrofóbico de la molécula polipeptídica taladra las regiones transmembrana y membranosa, para implantar en el **citoplasma** el radical de unos treinta aminoácidos, con el terminal carboxílico. La cadena β interactúa de forma no-covalente con la porción de la cadena pesada y no posee ninguna ligazón directa con la célula.

Características de las moléculas del MHC de la Clase I

La función principal de las moléculas de los MHC consiste en encadenar fragmentos característicos de las proteínas extrañas. De esa forma, los complejos superficiales de las membranas celulares son reconocidas por los linfocitos T. La fracción molecular del MHC clase I que realiza esta función, es una cadena alfa de unos 180 aminoácidos, con un grupo N-terminal-oligosacárido, en las cercanías de las regiones α -1 y α -2.

En la estructura cristalina de las moléculas proteicas del MHC de la clase I, se ha demostrado que existe una **conformación estructural única**. Las cadenas α -1 y α -2, interactúan y dan lugar a una plataforma de entramados de aminoácidos. Estos entramados poseen una fisura en forma de libro semiabierto que se supone que sirve para que las porciones de los péptidos extraños del antígeno procesado queden adheridos y, de esta forma, se realice la presentación a las células T.

Por distintos métodos analíticos, se han confirmado estos hechos del comportamiento de las moléculas del MHC de la clase I, que se resume en lo siguiente:

- a) Cada molécula del MHC posee un **único sitio de unión al péptido**, por lo que cada uno de los péptidos estimulan la respuesta inmunológica del linfocito T en el mismo sitio.
- b) La activación de los **linfocitos B** frente a los antígenos para producir los **anticuerpos**, se realiza principalmente a través de un **proceso más bien libre**. Consiste en mutaciones adaptativas que producen los receptores que bloquean estructuras antigénicas. En los **receptores de los linfocitos T**, la especificidad se determina únicamente por un proceso de recombinación de DNA dependiente del alelo del MHC heredado

por vía germinativa. El polimorfismo estructural del sitio de unión hace suponer que las distintas formas alélicas de las moléculas del MHC podrían diferir en sus respectivas capacidades para pegarse estructuralmente a los distintos antígenos peptídicos.

- c) **La selección natural positiva de cada una de las especies** ha desarrollado el extraordinario **polimorfismo de las moléculas del MHC**, de forma que las especies expresen los numerosos **alelos** capaces de unirse a los distintos péptidos extraños. Cuando se da el caso de que el número de moléculas variantes del MHC está limitado, un germen puede simplemente mutar sus antígenos, para conseguir estructuras que **pasen desapercibidas** al reconocimiento de los linfocitos T.

4.2.3. *Las moléculas del MHC de la clase II*

De las moléculas del MHC de la clase II se conocen las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, así como sus estructuras. Se ha confirmado que existen grandes similitudes con las correspondientes a las moléculas del MHC clase I; así, paralelamente a lo que ocurre con aquellas, las moléculas del MHC de la clase II, están dispuestas en cuatro regiones virtualmente separadas entre sí: a) Zona o región de **unión a péptidos**; b) Zona similar a una **inmunoglobulina**; c) Región transmembranal, y finalmente, d) Región **citoplasmática**.

En conjunto, las moléculas del MHC de la clase II están formadas por dos cadenas polipeptídicas asociadas, similares entre sí. La cadena β , de unos 32 a 34 kD es algo mayor que la cadena α , de unos 29 a 32 kD, como consecuencia de una extensa glicosilación. Aquí, las dos cadenas mencionadas contienen grupos funcionales N-oligosacáridos; **dos N-amino terminales** que tapizan la superficie de la membrana extracelular, y dos funciones carboxilo terminales en la región citoplasmática. En el MHC de la clase II, más de las dos terceras partes de la cadenas, se extiende por la superficie extracelular. Cada una de las cadenas está codificada por genes distintos, y la mayor parte de ellas, son **polimórficas**.

En las moléculas expresadas por el MHC de la clase II, la región de unión a los péptidos está mantenida por una interacción de ambas cadenas, comprendiendo los segmentos α -1 y β -1. La fisura de encadenamiento a los péptidos es, pues, responsabilidad de **ambas cadenas**, mientras que, en las moléculas del MHC clase I lo es únicamente de la cadena α -1. Tal como sucede con las moléculas del MHC de la clase I, el polimorfismo genético de las moléculas del MHC-clase II, determina la superficie bioquímica de la fisura de libro semiabierto, y constituye el **determinante principal** de la especificidad, de la afinidad por la unión con el **péptido extraño** y el **reconocimiento por el receptor del linfocito T**.

Se requiere un alto **nivel de polimorfismo** para evitar el posible accidente de que los péptidos del antígeno no encuentren estructuras a las que unirse en las moléculas del MHC de la clase II.

4.3. Investigaciones sobre la memoria inmunitaria.

Aparición y persistencia

Aunque, como consecuencia del primer contacto con el antígeno, se desencadena la producción de anticuerpos, y este fenómeno podría terminar en unas pocas semanas, sin embargo, el individuo queda con el **recuerdo** de esta **agresión antigénica**, almacenada en sus células inmunitarias de memoria ⁶⁹.

La **capacidad anamnésica**, junto con la **especificidad**, es precisamente una de las características principales del sistema inmunitario de los vertebrados.

Esta propiedad facilita la **utilización de la vacunación** o inmunización como mecanismo activador de los linfocitos B o de los linfocitos T.

La **memoria inmunitaria** aparece cuando se provoca su aparición mediante una segunda dosis, o una dosis de recuerdo, del mismo antígeno. El tiempo de aparición de la respuesta antigénica, en este caso, se hace considerablemente más breve del que había requerido la aparición de la respuesta primaria. La calidad de la respuesta primaria es mejor en IgM, e IgG en la secundaria, pues probablemente, por un proceso de selección, ha mejorado la afinidad o capacidad de unirse a las moléculas del antígeno, y los niveles de concentración son más altos. La persistencia de la protección puede durar varios años, gracias a la existencia de memoria inmunitaria.

No se conoce todavía el verdadero mecanismo de formación de las **células de memoria**. Se piensa que el precursor está en la división rápida del linfocito B, el **centrocito**, dentro de los centros germinales. Hay algunas hipótesis basadas en la propuesta de tres modelos ⁷⁰:

- a) El precursor inmediato se convierte bien en una célula de memoria, o bien en una célula plasmática por división desigual.
- b) Distintas **linfoquinas**, procedentes de otras células, producen la correspondiente diferenciación, y
- c) Diferentes precursores de las series de los linfocitos B, son los orígenes de células plasmáticas, o de memoria.

⁶⁹ Bruce J, Symington FW, McKearn J, Sprent J. (1981). A monodonal discriminating beebNeen subsets o T cells. *J Immunol* 127:2446-2451.

⁷⁰ Gray D. (1993). *Immunological memory*. *Ann Rev immunol*, 11: 49-77

Se cree que los linfocitos B de memoria, expresan **niveles altos de linfocinas** que son importantes para la interacción de los linfocitos T CD4+, porque se las estimula más fácilmente por los mecanismos circundantes diferenciados, que con las otras células⁷¹.

4.4. Antígeno e inmunógeno

Se denomina **antígeno** a cualquier sustancia que, específicamente, pueda unirse a una molécula de anticuerpo. En cambio, **inmunógeno** es el antígeno que, además, es capaz de desencadenar una **respuesta** inmunitaria.

Cualquier molécula biológica tal como simples metabolitos intermedios que no provengan del individuo, azúcares, lípidos, autocoides y hormonas, así como macromoléculas de tipo de carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, y proteínas, pueden ejercer como antígenos, pero **solamente las macromoléculas pueden actuar como inmunógenos** e iniciar la activación de los linfocitos para que se produzca la respuesta inmunitaria.

Se considera hapteno a las moléculares pequeñas o sencillas que, por sus estructuras particulares, poseen propiedades inmunogénicas, pero que no pueden expresarlas libremente, por sí solas, si no se unen a una macromolécula portadora. Las macromoléculas portadoras de haptenos son proteínas extrañas al individuo. Hay haptenos que son reconocidos específicamente por el sistema inmunitario, previamente inmunizado frente a ellos. No tienen por sí mismos capacidad de respuesta, es decir no son inmunógenos.

Se denomina **determinante antigénico o epítopo**, a la zona o estructura que, específicamente se une o suelda a la molécula de anticuerpo. Generalmente, las macromoléculas tienen un volumen mucho mayor que la región que se une al anticuerpo. Podría considerarse que un hapteno es un determinante exógeno que está pegado a la macromolécula⁷². En muchos casos, las macromoléculas contienen numerosos determinantes antigénicos que pueden ser ocupados por moléculas de anticuerpos. En ciertos casos, las estructuras espaciales de los determinantes antigénicos, están bien separadas y pueden recibir dos moléculas consecutivas de anticuerpos, sin que exista ninguna interferencia de una con la otra. Se trata de determinantes **no-solapantes**.

⁷¹ Johnson JG Jemmerson R, (1991) Relative frequency of secondary B cells activated by cognate vs other mechanisms. Eur J immunol 21: 951 a 958.

⁷² Goodman JW, Immunogens and antigens. Basic and clinical immunology. (1994), De Prentive-Hall, International inc, pg 50-57.

En otros casos, la primera molécula de anticuerpo que se adhiere, interfiere estéricamente con la segunda, considerándose que el determinante del antígeno es **solapante**. En ocasiones menos frecuentes, se observan **efectos alostéricos** (del griego *allos*: diferente). Se trata de que la primera molécula que se une, puede causar un cambio conformacional en la estructura del antígeno, interfiriendo en la unión de la segunda molécula, por estorbo o razones distintas de las estéricas.

Existen dos tipos de antígenos inmunizantes. Los **T-dependientes**, que requieren el concurso de los **linfocitos Th₂**, para activarse, mientras que los **T-independientes** no requieren la mencionada concurrencia para iniciar sus acciones efectoras.

En los fosfolípidos, y en las moléculas complejas de carbohidratos, los **determinantes antigénicos se pliegan**, adoptando estructuras de **enlaces covalentes**, aunque algunos pliegues no-covalentes de la macromolécula, contribuyen a la formación de algunos determinantes inmunitarios.

Está demostrado que el tamaño del **determinante antigénico** juega un papel marcadamente importante en la consecución de la **respuesta inmunitaria deseada**, como se ha visto en la investigación de microesferas y de liposomas. Es muy probable que el sistema inmunitario responda más fácilmente a las estructuras **multiméricas**, que a las **monoméricas**. Como el receptor de la IgM del linfocito B es bivalente, la **estructura polimérica** se une con mayor avidez a los receptores adyacentes. De esta forma, la célula presentadora del antígeno lo incorpora más fácilmente a su interior para procesarlo.

Se calcula que, para que el linfocito T responda, se necesita de cien a doscientos complejos MHC-peptídico, por cada célula B presentadora⁷³. Esta masa se consigue mejor con partículas multiméricas⁷⁴.

4.5. Modulación de la respuesta inmunitaria

Considerando la complejidad de la respuesta inmunitaria, y la posibilidad de que pudiera causar trastornos irreparable al organismo humano, es evidente que existen numerosos controles para que el sistema actúe bajo rigurosas condiciones de regulación, como cualquier otro sistema fisiológico. El control se ejerce a través de interacciones celulares de muchos tipos. Dichos controles gradúan la respuesta, aumentándola o reduciéndola. Muchos productos solubles

⁷³ Harding CV, Unanue ER. (1990). Quantification of antigen-presenting cell MHC-class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346: 574-576.

⁷⁴ Dmotsch S, Grey HM, Sette A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T-cell activation. *Science* 249: 1028-1030.

actúan también como inhibidores o estimulantes de esos controles. Las investigaciones que se realizan sobre las sustancias inmunomoduladoras sintéticas que controlan la expresión de las respuestas inmunitarias, prometen muchos avances en el futuro de cara a la utilización del sistema inmunitario en beneficio de la salud. Las técnicas de aislamiento de genes, de replicación clonal, y de biosíntesis, han contribuido ya a comprender mejor este sistema tan importante.

Ya se ha tratado, aunque brevemente, de algunos conceptos tales como de la necesidad de la entidad portadora, generalmente molécula peptídica o proteica, para que contribuya a la expresión de los **haptenos**, incapaces de desarrollar respuesta inmunológica por sí solos, a no ser que se unan a moléculas mayores, constituyendo entonces, complejos hapteno-portador. La forma farmacética de presentación de los antígenos, por ejemplo en **soluciones acuosas**, o en aceite mineral, describe el término **vehículo** o condiciones que acompañan a los **inmunógenos** en su actuación.

CAPÍTULO V

5. LOS MÉTODOS RECIENTES DE INVESTIGACIÓN DE VACUNAS

La mayor parte de las vacunas utilizadas hasta el momento han sido desarrolladas **empíricamente**. Durante las pasadas dos décadas, a pesar de la carencia de conocimientos científicos y de la experimentación clínica exigible para garantizar la eficacia y la seguridad de los agentes inmunológicos, aquellas vacunas continúan, hasta ahora, cumpliendo bien con sus cometidos. En los años de sus correspondiente auges, no se disponía del entendimiento de las **bases celulares** ni moleculares de la inmunidad, ni apenas se vislumbraban las circunstancias y condiciones de la respuesta inmunitaria.

Se ha avanzado mucho y ahora se cuenta con algunos conocimientos científicos adicionales, que se espera aplicar al mejoramiento de las vacunas disponibles, así como a la investigación de las nuevas.

A pesar de todo, las vacunas actuales son eficaces y han permitido controlar el aumento y la extensión de muchas enfermedades infecciosas y disminuir las tasas de morbilidad y de mortalidad atribuibles a las patologías evitadas.

Además, en su balance positivo se anota la **erradicación de la viruela**, enfermedad grave que ocasionó muchos trastornos y muertes, así como otros hechos relevantes de intervenciones preventivas que han puesto a los diferentes sistemas sanitarios en el camino que conduce a un mejoramiento del estado de salud de la humanidad, especialmente de los niños, sin olvidar a los individuos sanos pertenecientes a otros grupos etarios.

Las vacunas tradicionales pueden estar constituidas por **cepas vivas atenuadas de microorganismos inmunógenos** patogénicamente inactivados. En algunos casos, se trata de microorganismos enteros y en otros de subunidades antigénicas y toxoides. Pueden encontrarse en condiciones de mayor o de menor purificación. Pero muchas de las vacunas tradicionales son todavía muy útiles y, sobre todo eficaces como medios de prevención de infecciones.

Pueden presentar ciertos inconvenientes serios que se deben al propio principio inmunogénico que contienen. Si son microorganismos vivos atenuados, podrían presentarse **reversiones virulentas** como, con probabilidad escasa, puede observarse en el caso de la vacuna de la poliomielitis del tipo Sabin. Por otra parte, los problemas de escasa eficacia, que a veces ocurren, podrían ser debidos a la base genética e implícitamente al comportamiento inmunitario del vacunando.

Es conveniente, y se precisa dedicar nuevos esfuerzos y enfoques actualizados, a los distintos proyectos de investigación, adaptándolos a las realidades científicas y técnicas del momento, para lograr la **mejora de las vacunas disponibles actualmente**. Pero también sobre nuevos agentes inmunógenos frente a muchos patógenos, tales como frente el VIH, la lepra, la **malaria**, la tuberculosis, las **clamidias** y otros más que, desde la antigüedad, continúan causando trastornos graves a la humanidad.

Por otra parte, las enfermedades infecciosas continúan constituyendo una constante amenaza para la salud del hombre. Los patógenos comunes, cuando se considera que ya están controlados por acciones de inmunización o por la acción de los **antibióticos**, adquieren virulencias mayores o se hacen **resistentes** mientras que, por otra parte, algunos microorganismos exóticos emergen o surgen desde algún reservorio oculto o procedentes de un animal en el que han evolucionado o mutado hasta convertirse en patógenos para el hombre y llegan a ocasionar enfermedades, al menos de momento, incurables ⁷⁵.

Obviamente, es preciso considerar necesario potenciar la mayor y más eficaz actividad investigadora para descubrir métodos nuevos y mejorados, dirigidos a conseguir el deseado estado de inmunidad protectora frente al mayor número posible de enfermedades infecciosas.

Hasta muy recientemente, las **estrategias** disponibles para el desarrollo de vacunas eran muy **limitadas**. En particular, las vacunas preparadas con células bacterianas enteras, o con partículas virales íntegras, contenían componentes irrelevantes para los fines de la inmunización. La inmunización debe estar **dirigida exclusivamente a estimular las respuestas protectoras** frente a la infección, desarrollada por el sistema inmunitario. Claro que algunos de los citados componentes innecesarios pueden causar daño y también **potenciar las reactividades locales o sistémicas de la vacuna**.

Las cepas obtenidas por los métodos empíricos que se utilizaban hace algunos decenios constituyen un **posible riesgo** porque las mutaciones conseguidas a base de pases en distintas especies pueden dar resultados que son impredecibles y podrían revertir hacia la virulencia o perder sus propiedades

⁷⁵ Whalen RG, *DNA-vaccins for emerging infectious diseases* (1996), 2(3): 168-75.

inmunogénicas. De forma similar, los **toxoides preparados químicamente** podrían recuperar su toxicidad de origen si el proceso de inactivación es incompleto o, por otro lado, perder su eficacia protectora, si la inactivación se verifica en exceso. En todos esos casos, la **naturaleza indefinida de los antígenos** obtenidos, hace difícil conseguir seguridad, consistencia y uniformidad de las condiciones de calidad de las vacunas procedentes de lotes distintos que podría suponer problemas para el fabricante y para las autoridades sanitarias que se responsabilizan de la liberación de los lotes.

5.1. Bases generales para la investigación de vacunas

En las últimas décadas, las opciones para diseñar y para fabricar vacunas han mejorado considerablemente. Los avances conseguidos por la tecnología del **DNA-recombinante**, la aplicación de la tecnología de la **clonación molecular**, el mejoramiento de los métodos bioquímicos de purificación y un mejor entendimiento de la **inmunología básica** de la vacunación, han dado lugar a la producción de numerosas vacunas constituidas por subunidades. Esto supone utilizar entidades moleculares puras. Sin embargo, las moléculas más sencillas, las subunidades y las sustancias purificadas, tienen poca capacidad inmunogénica y han requerido desarrollar la investigación de **adyuvantes** (del Latín "*adjuvare*", que significa ayudar), más activos, más específicos y de sistemas de liberación en los sitios de acción más adecuados. Se necesita que los nuevos adyuvantes exalten, modulen y acerquen las estructuras antigénicas al sistema inmunitario, para lograr la **optimización** de la respuesta deseada.

Asimismo, los desarrollos conseguidos por la **biología molecular** han proporcionado medios de investigación de nuevas generaciones de vacunas, y de toxinas nativas destoxicadas. Los problemas especiales de pobreza inmunogénica de las vacunas de polisacáridos capsulares se van resolviendo con las aplicaciones de la **conjugación con proteínas** y con el empleo de fracciones subcelulares y de componentes de las **proteínas de la membrana externa**. Uno de los desarrollos más importantes experimentados por las vacunas probablemente consista en la reciente tecnología de preparar principios inmunológicos partiendo de **ácidos nucleicos**. La inmunización con material genético purificado tiene, entre otras, las siguientes ventajas:

- a) Presentar el antígeno en forma nativa al sistema inmunitario. De esta forma, se actúa y dirige íntimamente sobre los componente asociados de los **complejo MHC** de las clases I y clase II.
- b) Se facilita la manipulación y el desarrollo de la respuesta inmunitaria.
- c) Se mejora la estabilidad química y biológica de los antígenos, los cuales se generan en el mismo sitio de su actuación.

Las direcciones principales hacia donde discurren ahora los trabajos de investigación de vacunas se podría resumir en los siguientes temas principales, aunque la imaginación del investigador frecuentemente cambia los esquemas establecidos:

- I. Vacunas de componentes purificados;
- II. Antígenos sintéticos y anti-idiotipos;
- III. Neoglicoconjugados;
- IV. Cepas genéticamente modificadas;
- V. Vacunas de ácidos nucleicos;
- VI. Sistemas novedosos de liberación de antígenos.

La disponibilidad de una vacuna, herramienta tan importante para la ejecución de los programas de Medicina Preventiva, depende principalmente de:

1. Los avances de la investigación básica en etiopatogénesis de la enfermedad;
2. Del conocimiento de la generación de la respuesta inmunitaria tras la infección;
3. Del desarrollo tecnológico que permita utilizar procedimientos eficaces para modular y manejar el sistema inmunitario, de forma que surjan las condiciones de protección deseada.

Hasta hace pocos años, no existía una base para esperar lograr inducir las respuestas inmunitarias particulares deseadas, tales como las de inmunidad celular de diferentes isotipos de inmunoglobulinas a través de la vacunación. Sin embargo, ya se ha encontrado que algunos adyuvantes, tales como el sulfato de dextrano, inducen preferentemente respuesta IgG₂ frente a algunos antígenos bacterianos^{76,77}.

Además, como ya se ha mencionado en alguna parte de este estudio, se ha demostrado que los antígenos poliméricos inducen mejores respuestas IgM que las formas monoméricas⁷⁸.

En experimentación animal, Roitt y colaboradores⁷⁹ han podido demostrar que la citoquina IL-2 aumenta la producción general de inmunoglobuli-

⁷⁶ Watson DL. (1987) Serological response of sheep to live and killed *Staphylococcus aureus* vaccines. *Vaccine* 5:275-278.

⁷⁷ Pike BL (1992) cytokines acting on lymphocytes. In Roitt ML, Delbes PJ. *Encyclopedia of Immunol.* Acad.Press, NY. pg. 440-441.

⁷⁸ Nossaly GJV, Ada GL, (1971). Antigen, lymphoid cells and the immune response. *Acad.Press*, NY pgl-324.

⁷⁹ Roitt IM, Brostoff J and Male DK. (1993). *Immunol.* Mosby, London.

nas; que la **IL-4**, suprime la producción y secreción de IgG2a, de IgG2b, y de IgG3, pero aumenta las de IgG1 e IgE; que la **IL-5**, aumenta la de IgM, IgG e IgA; que la **IL-6**, aumenta la protección de las mucosas a través de la producción y secreción de IgA, pero también estimula las respuestas IgG; que la **IL-10**, aumenta las IgG e IgM, el IFN- γ , como ya se ha mencionado, aumenta la producción y secreción de IgG2a, pero disminuye las de IgG1, IgG2b, IgG3 e IgE.

La posibilidad de lograr respuestas deseadas, por ejemplo lograr la **inducción** selectiva de las correspondientes a las de tipo 1 de células T y, especialmente, las de los linfocitos citotóxicos, ofrece un gran interés. Indudablemente la observación de estos fenómenos de **respuestas selectivas**, es más fácil en los casos en que la infección se produzca en una **célula «profesional presentadora de antígeno»** (APC) -**macrófagos**, células dendríticas o linfocitos B), que son muy activas en este sentido-.

Estas células despliegan dos acciones básicas: la **expresión** de los antígenos de los **complejos MHC-I y MHC-II**, dependiendo de la que haya sido activada, y la producción de uno o más tipos de **moléculas co-estimuladoras**.

Los linfocitos T, generalmente las **moléculas CD28**, son los responsables de expresar el **ligando** correspondiente para que se produzca la interacción. La expresión de estas moléculas es estimulada por la actuación de **citoquinas** tales como IFN- γ . La **IL-7**, **que activa fuertemente al linfocito citotóxico**, también es un eficaz inductor de la formación de moléculas coestimulantes^{80,81,82}.

5.2. Condiciones Mínimas de las vacunas que se investigan

Además de cumplir con los requerimientos de **seguridad** (reactogenicidad baja), **inmunogenicidad** aceptablemente buena, **estabilidad**, **homogeneidad** de lote a lote, y con otras condiciones que puedan considerarse en cada caso particular, la **experimentación animal** y los **ensayos clínicos en humanos** han demostrado que, aparentemente, existen al menos cuatro condiciones mínimas que una vacuna debe cumplir con el propósito de conseguir **estimular el sistema inmunitario**, de forma que el individuo se encuentre protegido frente al germen patógeno contra el que se desea inmunizar:

⁸⁰ Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, Armitage R, Cooper, MD. (1989) Human IL-7; a novel T cell growth factor. *J. Immunol* 143:3562-3566.

⁸¹ Nara PL, Smit L, Dunlop N et al (1990) Emergence of viruses resistant to neutralization by V3 specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type III B infection of chimpanzee. *J. Virol* 64:3779-3791.

⁸² Parry N, Fox G, RovAands D, et al(1990)Structural and serological evidence for a novel method of antigenic variation in foot and mouth disease virus. *Nature* 347: 569-572.

1. La vacuna tiene que **activar a las células presentadoras del antígeno** (o de los antígenos), es decir han de estimular el procesamiento de las moléculas antigénicas a través de la vía liposómica o citoplasmática y provocar la expresión de los marcadores específicos del antígeno en la superficie de la célula.
2. Asimismo, la vacuna tiene que estimular la **secreción de citoquinas** y de los factores **estructurales receptores de epítomos** y de moléculas coestimulantes requeridas en el proceso inmunitario.
3. La vacuna tiene que estar dotada de capacidad de **activación** y de **diferenciación de los clonos específicos** de los linfocitos T y B, de forma tal que se produzcan **fondos de reserva** suficientemente altos para que, desde ellos, se nutra la formación de **células de memoria** de ambos tipos de linfocitos T y B.
4. La vacuna tiene que estimular la incorporación de un número suficiente de **epítomos y/o de determinantes antigénicos** que se unan específicamente a los haplotipos (combinación particular de genes íntimamente fundidos sobre un cromosoma), regionales más importantes con el complejo reconocido por los receptores de los linfocitos B y T.
5. Persistencia a largo plazo de la estructura conformacional del antígeno intacto, preferentemente en forma de **agregados complejos del antígeno**, con el anticuerpo y fijados en la superficie de las células dendríticas foliculares del tejido linfoide. Esto permitiría la formación continua de linfocitos B de memoria, que son movilizados para que produzcan las células secretoras de anticuerpos específicos que posean cada vez mayor afinidad por los antígenos.

La **investigación de nuevas vacunas**, así como el mejoramiento de las que se están utilizando, exige **enfoques más científicos** cada día. Desde la perspectiva de encontrar **estructuras inmunógenas** que sean fuertemente protectoras frente a infecciones por germen determinados, se precisa ahondar muy profundamente en los conocimientos biológicos, químicos, físicoquímicos y fisiopatológicos del agente causante de la enfermedad. Estos estudios previos no pueden obviarse porque constituyen la base más sólida que, en su día, permitirá la identificación y el aislamiento de los componentes moleculares y **epítomos**, así como de las estructuras acopladoras que juegan el papel principal en el desencadenamiento de las respuestas inmunitarias específicas.

Aunque el descubrimiento de vacunas se basaba, hasta hace unos años, en observaciones empíricas, el conocimiento íntimo de los pormenores sobre **cómo** se produce la **respuesta inmunitaria**, se dirige a fundamentar sólidamente el proyecto de investigación por la vía más científica y razonable. Así pues, los

estudios inmunológicos de la respuesta ofrecen la vía única de investigación que se dirige a encontrar resultados tangibles aplicables al descubrimiento de nuevas vacunas que sean seguras y eficaces.

Las primeras fases de esta investigación se fundamentan en lograr el mayor número posible de datos proporcionados por la **investigación básica** sobre la **etiopatogénesis** que caracteriza al agente causal. Es importante conocer las **vías de transmisión** y de entrada en el hospedador, los períodos de incubación, el intervalo transcurrido entre el momento del contacto con el agente causal y el de aparición de los primeros síntomas y los marcadores hemáticos. También, conviene descubrir los factores y mecanismos enzimáticos que intervienen en la entrada a través de los epitelios, las mucosas y las membranas celulares, así como aquellos que facilitan, y los que limitan, su multiplicación endo o extracelulares.

Los agentes patógenos se comportan de forma imprevisible y, generalmente, no se dispone de los datos necesarios para iniciar la investigación que ofrezca menores riesgos de fracaso. Cuando esto ocurre, es una gran suerte el hecho de disponer del sistema de **modelo de animal adecuado** para la experimentación en el laboratorio, así como de los métodos analíticos para evaluar las respuestas inmunitarias. En numerosas ocasiones, la investigación de vacunas se inicia con el desarrollo de los métodos analíticos que son necesarios para evaluar los datos que se pudieran ir generando durante el trabajo experimental, así como con la búsqueda y prueba de distintos modelos animales que se adapten más al proyecto investigador.

5.3. Algunas consideraciones sobre la investigación de vacunas

La investigación es una actividad llena de incertidumbre pero, en este caso, constituye la única vía racional de acercamiento al problema de encontrar moléculas adecuadas para ser consideradas como candidatas a vacunas y estructuras capaces de desencadenar respuestas inmunitarias protectoras del huésped frente al patógeno con probabilidades de éxito.

La ingeniería genética, los avances tan rápidos de la biología molecular y de la **tecnología del DNA-recombinante**, permiten disponer de un gran número de herramientas y de sustancias que, al menos teóricamente, son determinantes antigénicos, posibles **epítomos**.

Cuando se dispone de un **modelo animal apropiado**, podrían iniciarse los ensayos experimentales convenientes para evidenciar las propiedades adecuadas de inmunogenicidad y de reactogenicidad de las sustancias candidatas a vacunas.

El desafío que supone llegar a disponer de las necesarias vacunas preventivas nuevas, y de las **vacunas terapéuticas deseadas**, será una prueba real de la consistencia de los conocimientos alcanzados a través de la **investigación básica** sobre inmunología. Especialmente importante será saber como se comportan los mecanismos inmunológicos, desentrañar los secretos patogénicos específicos propios del germen que se estudia y la situación de los avances científicos y tecnológicos de los procesos que se están aplicando.

El reconocimiento de los **epítomos** del germen por los linfocitos se puede interpretar, a la luz de los conocimientos actuales, por las **interacciones moleculares**. La interacción del receptor del linfocito T con el epítipo peptídico procesado que se presenta en el **hueco estructural de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad**. Por el contrario, aún parece que se está lejos de poder encontrar una interpretación molecular satisfactoria sobre los factores que controlan el **resultado biológico de la respuesta inmunitaria**.

El control de las consecuencias biológicas de la inmunización podría responder a la existencia de una **cadena compleja de acontecimientos moleculares**, que comprende **transmisiones de citoquinas**, equilibrios entre actuaciones de linfocitos Th_1/Th_2 y de otras **interacciones linfocitarias**. También parecen estar presentes **fenómenos de penetración celular**, de adherencias celulares, movilizaciones de distintas sustancias y muchas y diferentes **interacciones de ligando-receptor** entre los linfocitos y las **células presentadoras** de antígenos.

Evidentemente, todo lo que suponga ahondar en el conocimiento de cómo se origina la respuesta biológica a la inmunización constituye un punto de interés máximo y clave de la investigación de las estructuras moleculares aplicables a la formulación de una nueva vacuna. Además, supone disponer de bases más sólidas, aplicables a las interpretaciones de los datos que surgen de la observación de los procesos bioquímicos y de biología molecular en la respuesta inmunitaria, por sí solos. Únicamente son capaces de desencadenar la respuesta inmunológica con la consiguiente producción de anticuerpos, cuando están **unidos por enlaces covalentes** a proteínas portadoras.

5.4. Factores que favorecen el desarrollo de vacunas

Existe una serie de factores que favorecen el desarrollo de vacunas eficaces para controlar y para llegar a erradicar una **enfermedad infecciosa**. Los siguientes parecen ser los más importantes:

5.4.1. *Factores dependientes del agente infeccioso*

1. Son circunstancias favorables para conseguir una vacuna eficaz el que el agente infeccioso posea solamente uno, o **un número reducido de serotipos importantes**. Cuando se originan pocos o ningún cambio antigénico y no existe tendencia hacia ello.
2. Si el agente puede causar solamente **infección moderada** o escasamente importante.
3. Cuando los gérmenes causantes son vehículos de **epítipo interesante** para los linfocitos B, o de determinantes para los linfocitos T, y están ya adecuadamente identificados.
4. Si, según las vías de inmunización, la **inmunidad sistémica a largo plazo** es, hasta este momento más **fácilmente generada**, que la inmunidad a nivel de alguna zona de la mucosa.

5.4.2. *Factores que dependen de la infección*

1. Cuando la infección por un germen salvaje **produce inmunidad protectora** (caso de una infección aguda).
2. Si **se dispone de un modelo animal** fácilmente accesible, que imite bien el proceso infeccioso, marcando el comienzo característico de la enfermedad.

5.4.3. *Factores que afectan a la erradicación*

1. Si la infección es específica del individuo humano. Cuando no existe **ningún reservorio** del agente patógeno.
2. Si la infección da lugar a una enfermedad clínica característica, y **nunca** se presenta como infección preclínica, **ni existe el estado de portador**.
3. Si **se dispone de un marcador simple**, que evalúe el posible éxito de la vacunación.

5.5. Factores que dificultan el desarrollo de una vacuna

5.5.1. Factores inherentes al agente infeccioso

1. En los casos de mutación antigénica. Cuando existen muchos serotipos. Más bien, cuando se producen **cambios antigénicos** de importancia, es decir **tasas altas de mutaciones**, o tendencia a producirse. Este es el caso de las infecciones por el VIH tipo 1.
2. El germen es **altamente infeccioso**.
3. Existe la posibilidad de **cambios en el tropismo** de agente patógeno. Se identifica con las circunstancias correspondientes al VIH tipo 1.

5.5.2. Factores inherentes a la infección y a la enfermedad

1. La infección podría ser transmitida por **células infectadas**, que a su vez, podrían o no expresar al antígeno del agente patógeno. Existiría un período de latencia en el cual el sistema inmunitario reconocería al microorganismo que estuviera causando el trastorno.
2. El **DNA/cDNA se integra** dentro del genoma del hospedador.
3. La inmunidad protectora no se produce ni por la infección natural. Se originan **mutantes de escape**.
4. Cuando el agente **patógeno suprime** alguna respuesta inmunitaria protectora. Podría no llegarse a formar los anticuerpos de un isotipo apropiado. En ausencia de los fijadores de complemento.
5. **Los anticuerpos** que se originan podría servir para **extender la infección** a las células susceptibles (p.e., a los **macrófagos** y monocitos, como sucede en casos de infección por el VIH tipo 1).
6. Cuando algunas de las células que son funcionalmente claves del sistema inmunitario están infectadas o afectadas.
7. Si **no se dispone** todavía de un **modelo de animal** susceptible que pudiera imitar o sufrir la enfermedad humana.

5.5.3. Factores inespecíficos de resistencia a la infección

Los **factores inespecíficos** de resistencia a la infección pueden agruparse en los siguientes apartados:

1. Anticuerpos naturales y situaciones inmunitarias de protección cruzada ^{83,84}.
2. Células -NK (*natural killer* o linfocitos asesinos), que se encuentran en la sangre y en tejido linfoide, aunque supone una población reducida de leucocitos ⁸⁵.
3. Factores hormonales, producción de estrógenos y de hormona adrenocorticotrófica, en fase aguda ⁸⁶.
4. Factores genéticos.
5. Fagocitosis. La fagocitosis provoca la producción de citoquinas, sustancias parecidas a las hormonas que regulan numerosas respuestas celulares ^{87,88}.
6. Fibronectina, glicoproteína de alto peso molecular, que cubre los receptores de la superficie celular, y que puede, de esta forma, bloquear la unión a muchos microorganismos, aunque pueden facilitar la conjunción con otros ⁸⁹.
7. Integridad morfológica.
8. Microflora normal del hospedador.
9. Nutrición o estado nutricional.
10. Respuesta inmunitaria no-específica.
11. Secreciones excretorias normales y sus correspondientes fluides.

⁸³ Schneerson R, Robbins JB, (1975). Induction of serum haemophilus influenzae type b capsular antibodies in adults volunteers fed cross reacting *Escherichia coli*-075, k-100:45. N Engl JM. 272:1693.

⁸⁴ Griffiss JM (1975) Bactericidal activity by IgA of lytic antibody in human convalescent sera. J Immunol. 114:1779.

⁸⁵ Tatenka J, Cebra JJ, Rubin DH. (1995) Characterization of cytotoxic cells from reovirus-infected SCID mice: activated cells express natural killer and lymphokine-activated killer-like activity, but fail to clear infection. J Virol 69: 3910.

⁸⁶ Weinberg DE. (1984). Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. Rev Infect Dis. 6:814-31.

⁸⁷ Romagnani S. (1992) Induction of Th₁ and Th₂ responses: a key role for the natural immune response?.

Immunol Today, 13: 379-391

⁸⁸ Minty A, Chalon P, Dercq JM, et al. (1993) Interleukine 13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature 362:248-250.

⁸⁹ Vandaux P, Didier P, Haerberli A, et al. (1993). Fibronectin is more active than fibrin and fibrinogen in promoting *S. Aureus* adherence to inserted intravascular catheters. J Infect Dis 167:633-641.

5.6. Las Subunidades antigénicas

En la tablas de Actualización de la Investigación de Vacunas se incluye la situación de los distintos proyectos de desarrollo. Se comprobará que se están realizando numerosos trabajos basados en subunidades antigénicas.

La tecnología del DNA-recombinante ha desencadenado un vigoroso movimiento investigador hacia el descubrimiento y las obtención de numerosos componentes celulares y moleculares, que podrían convertirse en fracciones moleculares candidatas a vacunas formadas por **subunidades antigénicas**.

Es indudable que las subunidades ofrecen grandes **ventajas de manipulación biológica**, de obtención con mayor grado de pureza, de conocimiento de la clase de sustancia con que se está trabajando, etc.

La desventaja principal consiste en que, como la mayoría de las moléculas orgánicas pequeñas, **muchos péptidos no son inmunogénicos**. Mitchison⁹⁰ demostró que muchos **haptenos**, compuestos de pesos moleculares bajos, no son inmunogénicos.

Recientemente se ha demostrado que un **inmunógeno** no es eficaz, a menos que: a) Sea **polivalente** y pueda activar a los linfocitos B por unión cruzada a la superficie de una molécula de **inmunoglobulinas**, o bien, b) Cuando enlace con una molécula de una proteína del MHC y llegue a **tapizar la superficie de las células**.

La conjugación a una molécula grande de proteína, asegura que un fragmento de este complejo, tenga la posibilidad de unirse a una proteína del MHC, después de haber sido **endocitada, procesada proteolíticamente, y re-expresada** sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos.

Las subunidades poseen inmunogenicidades **débiles**, que se precisa **fortalecer** y reforzar mediante el empleo de **nuevos adyuvantes, nuevos sistemas de liberación en los sitios más inmediatos al sistema inmunitario, o de portadores antigénicos**, tales como polipéptidos, bacterias, virus no patógenos, plásmidos conteniendo DNA.

Por otra parte, los procedimientos de **ingeniería genética** molecular que ofrecen niveles superiores de pureza y de seguridad, también están facilitando el desarrollo de las tecnologías de la biología molecular, que proporcionan ocasiones de detoxificar toxinas, que antes se obtenían por métodos empíricos.

⁹⁰ Mitchison NA. (1971). Eur J Immunol. 1:10-19.

5.7. Situación actual de la investigación de vacunas

Es evidente que durante unos doscientos años, las morbilidades y las mortalidades de muchas enfermedades infecciosas (viruela, tétanos, difteria, poliomielitis, rubéola, sarampión, parotiditis) han experimentado reducciones espectaculares en todo el mundo, y especialmente en las zonas más empobrecidas, en donde la amenaza de infecciones es aún más grave por la falta de recursos.

Las vacunas que se han estado empleando desde **Jenner, Pasteur, Behring, Ender, Salk, Sabin**, etc. han obedecido a principios empíricos. A través de ellas, se ha logrado alcanzar un alto nivel de conocimientos sobre el comportamiento del sistema inmunitario ante la presencia de un antígeno. Por otra parte, ahora se conoce detalladamente las estructuras moleculares de los patógenos más importantes. Estas circunstancias, junto a los avances conseguidos en **ingeniería genética, tecnologías de clonación molecular** y otras, convierten lo que fue empirismo, en planificación racional de un proyecto de investigación de vacunas.

Hasta este momento, la vacuna de la hepatitis B obtenida por recombinación genética es el único fruto práctico de los esfuerzos científicos. Sin embargo, está en marcha un vasto programa de desarrollo de nuevas vacunas y de mejoramiento de las actuales en todo el mundo, como se puede apreciar en el conjunto de tablas de actualización que se insertan a continuación y que, de forma esquemática, demuestra el progreso de los distintos planes para las numerosas vacunas que se espera que vayan apareciendo en la práctica preventivista del próximo milenio.

Como ya se ha mencionado en varias ocasiones en este estudio⁹¹, en **investigación básica** se incluyen, como mínimas, las siguientes actividades: a) **Identificación del agente causal**; b) Estudio de las características etiopatogénicas; c) Investigación de la posible respuesta inmunitaria ante la infección real; d) Reconocimiento de las estructuras moleculares de los candidatos a vacunas. En la columna de **modelo animal**, se recoge toda la investigación requerida para el desarrollo de sistemas de modelo animal, con las mayores semejanzas biológicas posibles con el individuo humano.

Como **Fase I**, se entiende toda tarea de investigación que conduzca al conocimiento de los datos de seguridad y de eficacia del agente inmunogénico que se está estudiando.

Como **Fase II**, se comprende la ampliación de los estudios de seguridad y de inmunogenicidad, así como los que corresponden a las determinaciones de las dosis óptimas y del **esquema de inmunización**.

En la **Fase III**, se incluye el desarrollo del proyecto de **ensayos clínicos**, según las normas de la Organización Mundial de la Salud, que conduzcan gradualmente al establecimiento de la seguridad y eficacia.

⁹¹ Véanse apartados de 2 al 4 de este capítulo.

5.7.1. ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE VACUNAS.

SITUACIÓN EN DICIEMBRE 1996⁹²

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Bordetella pertussis</i>	Proteína de superficie expresada por vector (Salmonella y Cólera)	+	+	—	—	—
	Toxina pertussis (TP- inactivada)	+	+	+	+	+
	TP-recombinante	+	+	+	+	—
	TP purificada y hemoaglutinina filamentososa (HAF)	+	+	+	+	+
	TP purificada, HAF, pertactina (Pert), aglutinógenos (agg)	+	+	+	+	+
	TP purificada, HAF, Pert	+	+	+	+	+
	TP-rec., HAF, Pert	+	+	+	+	+
	Péptidos de TP-conjugados- CRM197, . (proteína mutante difteria)	+	+	—	—	—

⁹² National Institute of Health, Bethesda. Accelerated Development of Vaccines 1996. The Jordan Annual Report pg. 63-69.

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE VACUNAS (y II)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Bordetella pertussis</i> (Cont.)	Ciclasa adenilato purificado como antipertusis	+	+	—	—	—
	DTP-Hib-conjugada	+	+	+	+	+
	DTP-Hib-conjugada -HB (Hep.B)	+	+	+	+	—
	DTP-Hib-PI (polio inyectable)	+	+	+	—	—
	DTP-Hib-conjugada-PI-HB	+	+	+	+	—
	DTPa-Hib-conjugada -HB	+	+	—	—	—
	DTPa-PI	+	+	+	+	—
	DTPa-Hib-conjugada -PI-HB	+	+	+	+	—
DTPa-Hib	+	+	+	+	—	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Proteínas (WI-1) purificadas de células de levaduras	+	+	—	—	—
	Osp-A recombinante-SB	+	+	+	+	+
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Osp-A recombinante Connaught	+	+	+	+	+
	Osp-A purificada	+	+	+	+	+
	Osp-A expresada por BCG	+	+	—	—	—
	Osp-B purificada, Osp-C	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y III)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Coccidioides immitis	Esférulas inactivadas por formalina	+	+	+	+	+
	Proteína 7.3 kD recombinante	+	+	-	-	-
	Homogenado de esférulas (27 kD)	+	+	-	-	-
	Proteína 33 kD	+	+	-	-	-
	Proteína 7.3 kD en pc de DNA ³	+	+	-	-	-
Corynebacterium diphtheriae	Toxina recombinante	+	-	-	-	-
	Polisacárido capsular parcialmente purificado	+	+	-	-	-
Cryptococcus neoformans	Glicoconjugado de polisacárido capsular con toxoide tetánico	+	+	-	-	-
	Cepas vivas atenuadas	+	+	-	-	-
Cytomegalovirus	Subunidad de glicoproteína	+	+	+	-	-
	Subunidad multiproteica	+	-	-	-	-
	Genética (DNA)	+	-	-	-	-
Brugia malayi	Antígenos (paramiosina, etc.) purificados del parásito	+	+	-	-	-

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y IV)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Chlamydia sp</i>	Subunidad de la proteína principal de la membrana externa (PPME)	+	+	—	—	—
	Péptido purificado de la PPME	+	+	—	—	—
	Construcción con virus polio como vector	+	+	—	—	—
<i>Clostridium tetani</i>	Proteína pirogénica	+	+	—	—	—
	Toxina recombinante	—	—	—	—	—
Virus del Dengue	r-DNA purificado que expresa proteínas virales	+	+	—	—	—
	Clono infeccioso	+	+	—	—	—
	Virus quimérico	+	+	—	—	—
	Vector de <i>Vaccinia</i> vivo	+	+	—	—	—
	Subunidad de <i>Vaccinia</i>	+	+	—	—	—
	Subunidad de <i>Baculovirus</i>	+	+	—	—	—
	Péptido sintético	+	+	—	—	—
	Miscela / ISCOM	+	+	—	—	—
	Subunidad de levadura como vector	+	—	—	—	—
	Virus vivo atenuado	+	+	+	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y V)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Entamoeba histolytica</i>	Subunidad de levadura como vector	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	Derivado no-toxigénico de ETEC	+	+	+	+	-
	Subunidad de toxoide sintético (TS) y subunidad B Toxina termolábil (TL)	+	+	-	-	-
	Células muertas +subunidad B de toxina del cólera	+	+	+	+	-
Virus de Epstein-Barr (VEB)	Subunidad de fusión de TL + TS	+	+	-	-	-
	Subunidad glicoproteína (gp)-350	+	+	+	-	-
	Vaccinia recombinante que expresa el gp-350	+	-	+	-	-
	Péptido de inducción de linfocito citotóxico	+	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i> grupo A <i>Streptococcus</i> grupo B <i>Haemophilus</i> Ducrey	Péptidos de proteína-M unidos a portadores subunidad de toxina	+	+	-	-	-
	Epítipo de proteína-M expresado en vectores	+	+	-	-	-
	Construcciones de híbrido tetraivalente de proteína-M	+	+	-	-	-

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y VI)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Streptococcus grupo A	Péptidos-M unidos a portador de subunidad de toxina	+	+	+	—	—
	Proteína-M, expresadas en vector bacteria	+	+	+	+	—
	Constr. Multival.híbridos péptidos-M	+	+	+	—	—
Streptococcus grupo B	Glicoconjugados de tipos Ia, Ib, II, III, unidos a vector proteico	+	+	+	+	—
	Proteína principal de la membrana externa	+	—	—	—	—
	Hemolisina / citotoxina	+	—	—	—	—
Haemophilus Ducrey (cont.)	Receptor de hemoglobina	+	—	—	—	—
	Subunidad proteica conteniendo proteínas P1, P2, P6	+	+	—	—	—
	Glicoconjugado Hib-CRM-197* *proteina mutante atóxica de la difteria	+	+	+	+	+
Haemophilus influenzae no-tipable	Glicoconjugado Hib-PRP con toxoide difter	+	+	+	+	+
	Glicoconjugados Hib+toxoide tetánico	+	+	+	+	+
	Hib+PI+HB	+	+	+	+	—
Haemophilus influenzae tipo b (Hib)	Glicoconj.-Hib-PRP+PME de Men-tipo-B	+	+	+	+	+

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y VII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Virus hepatitis A	Cepa HIM175 partículas inactivadas-SB	+	+	+	+	+
	Partículas inactivadas cepaMSD	+	+	+	+	+
	Partículas inactivadas Connaught-PM	+	+	+	—	—
	Virus atenuado varias investigaciones	+	+	+	+	—
	Proteínas virales expresadas por vectores (Baculovirus o vaccinia) expresando proteínas	+	+	—	—	—
Virus hepatitis B	Proteína de core expresada por r-DNA	+	+	—	—	—
	Prot.virales expres.X cels.levadura rDNA	+	+	+	+	+
	Vectorizado por <i>Salmonella</i>	+	+	+	—	—
	Variantes	+	+	—	—	—
	Generación de linfocitos T citotóxicos	+	+	+	+	—
	Genéticas DNA	+	+	—	—	—
	r-DNA, plantas	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y VIII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Virus hepatitis C	DNA, expresando proteínas de superficie y epítopos	+	+	—	—	—
	Generación de linfocitos T citotóxicos	+	+	—	—	—
	Nucleocápsidas	+	+	—	—	—
	Genética-DNA	+	+	—	—	—
Hepatitis D	Péptidos sintéticos	+	+	—	—	—
	Baculovirus como vector	—	—	—	—	—
Hepatitis E	Proteínas expresadas	+	+	—	—	—
	Atenuado / recombinante	+	+	+	—	—
Virus del herpes <i>simplex</i> tipos 1 y 2	Subunidad	+	+	—	—	—
	Extracto	+	+	+	—	—
	Glicoproteína D / glicoproteína B	+	+	—	—	—
	Proteínas/glicoproteínas vector <i>vaccinia</i>	+	+	—	—	—
	Partícula viral defectuosa	+	—	—	—	—
	Genéticas-DNA	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y IX)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Virus del herpes <i>simplex</i> tipos 1 y 2	Replicación de virus defectuosos	+	+	—	—	—
	Glicoproteína D-recombinante	+	+	+	+	—
Histoplasma capsulatum	Proteínas purificadas (p.e.His-62), en levaduras de cerveza	+	+	—	—	—
	Proteína lab (HS-60) 6.2-recombinante	+	+	—	—	—
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Glicoproteína (gp)-160/LAI recombinante en células de insecto	+	—	+	—	—
	rgp-160 / MN en células de insecto	+	+	—	—	—
	rgp-160 / Thai clade E	+	+	—	—	—
	rgp-160 / LAI (en células de insecto), encapsulada, con adyuvante	+	+	—	—	—
	rgp-160 / LAI (en células de mamífero)	+	+	+	—	—
	rgp-160 MN (en células de mamífero)	+	—	+	—	—
	rgp-120 /SF2 (en levaduras)	+	+	+	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y X)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
VIH (cont.)	rpp-120 / SF2 (en células de mamífero)	+	+	+	+	—
	rpp-120 / LAI (en células de mamífero)	+	+	+	—	—
	rpp-120 / MN (en células de mamífero)	+	+	+	+	—
	Envoltura M8V del dominio neutralizante (V3)-conjugado PPD (de la cepa MN)	+	—	+	—	—
	Conjugada V3-PPD (7 cepas)	+	—	+	—	—
	Conjugada V3-toxina A (cepa MN)	+	—	+	—	—
	Péptidos-V3 (cepa MN)	+	+	+	—	—
	Péptidos-V3 (mezcla de cepas)	+	+	+	—	—
	Octopéptido-lisina-V3 (cepa MN)	+	+	+	—	—
	Octopéptido-lisina (15 cepas)	+	+	+	—	—
	Octopéptido-lisina-V3 (microparticulada)	+	+	+	—	—
	Ty-V3, partícula similar a la del virus	+	+	—	—	—
	Epitopo conjugado de V3.linfocito Th (CLITV-36)	+	+	+	—	—
	V3-BCG-recombinante	+	+	—	—	—
	V3- <i>mycobacterium conjugado</i>	+	+	—	—	—
	Partículas de V3-AgHbc	+	—	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XI)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
VIH (cont.)	Recombinante de V3-rinovirus	+	+	—	—	—
	Recombinante de V3-mengovirus	+	—	—	—	—
	Recombinante / LAI-V3-influenza	+	+	—	—	—
	Virus de la encefalitis equina venezolana-VIH-gag/LAI	+	+	—	—	—
	<i>Listeria monocytogenes</i> -VIH-1-gag / LAI	+	+	—	—	—
	Péptido-gag-en forma de lípido	+	+	+	—	—
	Péptido-HGP-30-p17-gag	+	—	+	—	—
	Ty-p24, en forma de partícula del virus	+	+	+	—	—
	rp24 (en células de insectos)	+	+	+	—	—
	rp24 (en células de levadura)	+	+	—	—	—
	VIH-1 inactivado	+	+	+	—	—
	VIH-1 como pseudovirus	+	+	—	—	—
	VIH-gag-V2, partículas parecidas al virus	+	+	—	—	—
	Envoltura (env) del VIH en <i>vaccinia</i> como vector	+	+	+	—	—
	Env.VIH +gag-pol en <i>vaccinia</i> como vector	+	+	+	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
VIH (cont.)	Env.de VIH, gag-pol en <i>vaccinia my attenuada</i>	+	+	—	—	—
	Env. VIH-1 en virus pox del canario como vector	+	+	+	—	—
	Gp-120, gag, proteasa, nef de las cepas MN y LAI, en virus pox del canario como vector	+	+	+	—	—
	Env-VIH-1/adenovirus como vector	+	+	—	—	—
	Env. gag-pol de VIH-1, en polivirus como vector	+	+	—	—	—
	Env. gag-pol de VIH-1, en polivirus como vector	+	+	—	—	—
	Nef de VIH-1 en mengovirus como vector	+	—	—	—	—
	Gag, o env, o nef de VIH-1 en <i>salmonella</i>	+	—	—	—	—
	Env. de VIH-1 en BCG	+	+	—	—	—
	V3- <i>Shigella</i> -recombinante	+	+	—	—	—
	V3- <i>Lactococcus</i> , recombinante	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XIII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
VIH (cont.)	Conjugado peptídico del V3-HGP30 p17 con toxina del cólera	+	+	—	—	—
	Rgp-120 en liposoma, con toxina del cólera	+	+	—	—	—
	Genética DNA del env. del VIH-1	+	+	—	—	—
	Genética DNA del gag del VIH-1	+	+	—	—	—
	Genética DNA, rev, del VIH-1	+	+	+	—	—
	VIH-2 inactivado	+	+	—	—	—
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-2)	Rgp-130, purificado del virión	+	+	—	—	—
	rgp-160 producido en células de insectos	+	+	—	—	—
	gag-pol,env VIH-2, en <i>vaccinia</i> muy atenuada	+	+	—	—	—
	Env. VIH-2 en <i>vaccinia</i>	+	+	—	—	—
	gag-pol, env del VIH-2 en pox del cana.	+	+	—	—	—
Papillomavirus humano	Env.gag del VIH-2 en <i>Salmonella</i>	+	+	—	—	—
	Proteína de la cápsida	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XIV)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Influenza virus</i>	Virus vivo atenuado, adaptado al frío	+	+	+	+	+
	Subunidad de hemaglutinina (HA) viral purif.	+	+	+	—	—
	Liposoma conteniendo hemaglutinina	+	+	+	—	—
	Péptidos específico -LCT purificados	+	+	+	—	—
	Virus inactivados microencapsulados	+	+	+	—	—
	Neuraminidasa viral inactivada purificada	+	+	+	—	—
	Subunidad de HA-rec.expr. en Baculovirus	+	+	+	+	+
	Nucleoproteína expresada en Baculovirus	+	+	+	—	—
	Transfección con plásmido de ácido nucleico que expresa subunidad de HA	+	+	—	—	—
	Partículas virales enteras inactivadas	+	+	+	+	+
Virus de la Encefalitis japonesa B	Clon infeccioso	+	+	—	—	—
	Proteína expresada por DNA purificado	+	+	—	—	—
	Virus vivo atenuado	+	+	—	—	—
	Vector de <i>vaccinia</i> vivo	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XV)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Legionella pneumophila</i>	Mutante atenuada	+	+	-	-	-
	Proteína de superficie bacteria purificada	+	+	-	-	-
	Parásito entero atenuado o muerto	+	+	+	+	+
Sarampión	Antígenos de superficie (gp63, 6kD, y lipofosfoglicano)	+	+	-	-	-
	Hemoaglutininas DNA-rec. y proteínas de fusión	+	+	-	-	-
	virus vivo atenuado	+	+	+	+	+
	Cepas múltiples, atenuados, títulos altos	+	+	+	+	+
	Vectorización por virus pox vivos	+	+	+	-	-
	Hemoaglutinina-DNA-rec. y proteínas fusión	+	+	-	-	-
<i>Moraxella Catarrae</i>	Proteína de membrana externa, alto peso molecular	+	-	-	-	-
<i>Mycobacterium leprae</i>	Antígenos 35kD de BCG + <i>M. leprae</i>	+	-	-	-	-
	Antígenos recombinantes en BCG	+	+	-	-	-
	BCG + <i>M. leprae</i> matados por calor	+	+	+	+	+

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XVI)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>M. leprae</i> , matados por calor y purificados	+	+	+	+	+
	Microbacterias vivas que actúan por reacción cruzada atípica	+	+	+	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	BCG + antígenos purificados de <i>M. Tuberculosis</i>	+	+	—	—	—
	Inmunógenos reactivos con linfocitos T	+	—	—	—	—
	Antígenos recombinantes en BCG	+	+	—	—	—
	<i>M. vaccae</i>	+	+	+	—	—
	Antígenos recombinantes en <i>M. Vaccae</i>	+	+	—	—	—
	rBCG que expresan citoquinas	+	+	—	—	—
	Mutante auxotrófico de BCG	+	+	—	—	—
	Vacunas genéticas de DNA	+	+	—	—	—
	Mutante auxotrófico <i>mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	—	—	—
	<i>Mycobacterium microti</i> vivo	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XVII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Proteínas recombinantes asociadas a membrana	+	+	—	—	—
	Proteína de membrana externa purificada	+	+	—	—	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Proteína (PI) principal de la membrana purificada	+	—	—	—	—
	Proteína PI recombinante	+	—	—	—	—
	Proteína de unión al ion ferroso	+	—	—	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> A y C	Muchos glicoconjugados	+	+	+	—	—
	Glicoconjugado + antígenos proteicos de <i>N. Meningitidis</i>	+	+	+	—	—
<i>Virus parainfluenza</i>	Virus atenuado adaptado al frío	+	+	+	+	—
	Subunidad de proteína F y HN de superficie	+	+	+	—	—
	Bovino atenuado	+	+	+	+	—
	Microencapsulada	+	+	—	—	—
	Recombinante/químico HN.F	+	+	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XVIII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III	
<i>Plasmodium spp.</i>	Antígeno de circunsporozoito expresado en muchos vectores	+	+	+	+	—	
	Antígenos de gametocitos	+	+	+	—	—	
	Antígenos de estadio en sangre	+	+	+	+	+	
	Antígeno de circunsporozoito (CS)	+	+	+	+	—	
	Antígenos pre-eritrocíticos no-circunsporozoito	+	+	—	—	—	
	Antígenos de gametocitos	+	+	+	—	—	
	Estadios de Vacuna combinada incorporando diferentes antígenos específicos	+	+	+	+	+	
	Poliovirus	Polo oral, virus atenuado, reversión estabilizada	+	—	—	—	—
		Atenuado oral	+	+	+	+	+
Inactivado		+	+	+	+	+	
Vivo sin reversión		+	+	—	—	—	
Virus quimérico		+	+	—	—	—	
Virus inactivados con inmunogenicidad mayor		+	+	+	+	+	

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XIX)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas cepacia</i>	Proteínas bacterianas purificadas, incluyendo Ag flagelar, LPS-O, purinas, muchas toxinas bacterianas inactivadas y antígenos polisacáridos de alto peso molecular. y glicocojugado	+	+	+	—	—
Virus de la rabia	rDNA virus vaccinia recombinante para uso en rabia salvaje (vacuna veterinaria) Cerebro infectado de mamífero con virus inactivado	+	+	+	+	+
Virus syncytial respiratorio	Virus replicado en cultivo celular inactivado Virus vivos atenuados de las cepas ts y/o ca	+	+	+	+	—
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Proteína F purificada Subunidades conteniendo proteínas principales de superficie (155 y 120 kD)	+	+	+	+	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XX)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
Rotavirus	Virus variados de rhesus atenuados para humanos	+	+	+	+	+
	Rotavirus humanos atenuados (adaptados al frío)	+	+	+	—	—
	Salmonella expresando VP4 o VP7 o ambos	+	+	—	—	—
	Bovinos atenuados/virus humanos variados (WC3)	+	+	+	+	+
	Cepas humanas en enfermerías	+	+	+	+	—
	Proteínas purificadas de rotavirus rDNA derivados en forma de partículas análogas al virus (VLPs)	+	+	—	—	—
	Virus vaccinia recombinante expresando VP4, VP7 o ambos	+	+	—	—	—
	Vacunas genéticas DNA	+	+	—	—	—
	Vivos atenuados	+	+	+		+
	Clono infeccioso	+	—	—	—	—
Virus de la Rubéola	Péptido sintético	+	—	—	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XXI)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Salmonella typhi</i>	Carbohidrato Vi	+	+	+	+	+
	Carbohidrato Vi-conjugado proteico	+	+	+	—	—
	Vivo atenuado Ty21	+	+	+	+	+
	Mutantes auxotrópico vivo atenuado	+	+	+	+	—
<i>Schistosoma mansoni</i>	Antígenos larvarios purificados	+	+	—	—	—
	Antígenos larvarios recombinantes	+	+	—	—	—
<i>Shigella spp.</i>	Conjugado proteico-polisacárido	+	+	+	+	—
<i>Shigella dysenteriae</i>	Mutante auxotrófico atenuado	+	+	—	—	—
<i>Shigella flexneri/sonnei</i>	Híbridos de E. Coli	+	+	+	+	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XXII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Glicoconjugados (4, 6B, 9N, 14, 18C, 19V, 23F) a proteína de membrana de meningococo B	+	+	+	+	+
	Glicoconjugados (1, 3, 4, 5, 6B, 7E, 9V, 14, 18C, 19V, 23F) a proteína de membrana externa de meningococo B	+	+	—	—	—
	Glicoconjugado (3, 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F) a toxoide téτανos	+	+	+	+	—
	Glicoconjugado (6B, 14, 19, 23F) a toxoide de téτανos	+	+	+	+	—
	Glicoconjugado (6B, 14, 18C, 19F) a CRM 197	+	+	+	+	—
	Glicoconjugado de (4, 6B, 9V, 14, 18C, 23F) a CRM 197 (Proteína mauritane de difteria.)	+	+	+	+	+
	Glicoconjugado (1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) a CRM 197	+	+	+	+	—
	Glicoconjugado (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F, 23F) a CRM 197 (proteína mutante de difteria)	+	+	+	—	—

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XXIII)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Toxoplasma gondii</i>	Antígeno (p30) purificado del parásito	+	+	—	—	—
	Parásitos vivos atenuados	+	+	—	—	—
<i>Treponema pallidum</i>	Lipoproteínas de superficie	+	+	—	—	—
	Atiídio tipo/fibronectina	+	+	—	—	—
Virus varicela zoster	Virus vivos atenuados	+	+	+	+	+
	Subunidades, glicoproteínas	+	—	—	—	—
	Glicoproteínas vectorizadas por vacuna	+	—	—	—	—
	Glicoproteínas vectorizadas por Ty	+	—	—	—	—
Encefalitis equina venezolana, encefalitis equina del este y del oeste	Partículas virales enteras inactivadas	+	+	+	+	+
	Cepas de virus atenuados	+	+	—	—	—
Encefalitis equina venezolana	Clones infecciosos	+	+	+	+	+

ACTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS (y XXIV)

Germen	Vacuna	Investigación básica	Modelo de animal	Fase I	Fase II	Fase III
<i>Vibrio cholerae</i>	Bacteria inactivada + subunidad de toxina B	+	+	+	+	+
	Vivo recombinante 01	+	+	+	+	+
	Vivo recombinante 0139 conjugado Lipopolisacárido	+	+	—	—	—
Virus de la fiebre amarilla	Virus atenuado	+	+	+	+	+
	Clono infeccioso	+	+	—	—	—

La + significa que los estudios se están realizando en la fase indicada. No quiere decir necesariamente que se haya completado el ensayo en esa fase.

5.7.2. *Vacunas de carbohidratos. Vacunas de polisacáridos*

Las estructuras de los carbohidratos no se sintetizan a nivel del ribosoma, sino que se necesita glicosiltransferasa para su formación.

Los polisacáridos existen como **formas moleculares dinámicas**, en lugar de como tramas rígidas. Sus estructuras se pueden comparar con las formas helicoidales de un resorte o muelle. Cuando se sujetan ambos extremos del muelle, presionándolos en un sentido o en el otro, lo podemos alargar o comprimir, en posiciones muy variables. Todavía más, se puede a la vez, combarle, hacerle rebotar, **imitando las distintas estructuras terciarias o cuaternarias** de una molécula. La unión del epítipo al receptor del sistema inmunitario en soluciones acuosas, se asemejaría a poder adaptar **formas confrontables** de “espaguetis” en ebullición.

Para apreciar las propiedades estereoquímicas de los **sialilhomopolímeros** de los polisacáridos capsulares, se necesita considerar la flexibilidad que proporcionan los **enlaces interatómicos**, la rotación de los ejes moleculares, las medidas de los ángulos y la motilidad potencial de la molécula.

Las moléculas de carbohidratos pueden enlazarse para constituir oligo y polisacáridos, de manera análoga a como lo hacen los aminoácidos para formar péptidos y proteínas. La gran diferencia está en la **estereoquímica**. Los flexibles **enlaces interatómicos** de los carbohidratos son mucho menos rígidos que los que poseen los péptidos y las proteínas, y no permiten que las moléculas de los polisacáridos sean suficientemente estables para constituir buenas vacunas.

En soluciones acuosas, las diferentes estructuras conformacionales se mantienen en equilibrio, y es muy difícil identificar cualquier **epítipo particular**⁹³. Por esta razón, existe una incertidumbre constante sobre si un oligosacárido de interés **inmunogénico** mantendría la parte epitópica de su molécula cuando se la prepara como vacuna o, por el contrario, imitará su estructura antigénica y, por lo tanto, será ignorada por el sistema inmunitario, o aún más, si el resultado de la respuesta inmunitaria se transformará en una **reacción indeseada** de naturaleza **autoinmune**.

En la naturaleza, en los sistemas biológicos de los mamíferos, los oligosacáridos se presentan conjugados a las proteínas o a los lípidos, por lo que, también en inmunología, cuando se trate de investigar o de preparar una vacuna cuyos **epítipos** sean sacáridos, se debe estudiar las posibilidades que encierran sus derivados **glicoproteicos** o **glicolípidos**.

⁹³ Drickamer K, (1988), J Biol Chem, 263: 9557-9560).

5.7.2.1. VACUNAS CONJUGADAS DE SACÁRIDOS-PROTEÍNAS

Muchos polisacáridos capsulares de bacterias son **inmunogénicos** en individuos adolescentes y adultos, pero no en niños menores de dos años. Son antígenos **linfocitos T-independientes**, que también fracasan en estimular memoria inmunitaria. Los neoglicoconjugados covalentes de polisacáridos o de oligosacáridos a una proteína portadora, lo convierten en antígeno **linfocito T-dependientes** eliminando este problema. Por este medio se han desarrollado vacunas eficaces, entre otras frente a *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus grupo B*.

La **conjugación química** de polisacáridos antigénicos a péptidos, garantiza la **linfocito-T dependencia** al sistema inmunitario. La actuación de los linfocitos T-helper en el proceso de inducción y de activación iniciada por el **epitopo específico** para el linfocito B, contenido en la molécula del polisacárido o del **oligosacárido inmunógeno**, es potencialmente aplicable a cualquier antígeno de naturaleza glucídica. Sin embargo, cuando se ha tratado de utilizar para el serogrupo B del meningococo, se ha encontrado que la proteína aumenta la inmunogenicidad, pero también aumenta las posibilidades de causar **reacciones de autoinmunidad cruzada**, razón por la cual esta línea de investigación, en este caso concreto, se encuentra obstaculizada. Hasta este momento, se han ensayado sólo unos pocos portadores proteicos. Los más utilizados han sido los toxoides tetánicos y diftéricos.

A través de este método de neoglicoconjugación, se han conseguido vacunas más eficaces y persistentes de polisacáridos capsulares de hasta 23 componentes del *Streptococcus pneumoniae*⁹⁴.

En las bacterias, en su estado nativo en el medio en que se desarrollan, los polisacáridos capsulares se encuentran conjugados a moléculas cortas de lípidos, a través de **fosfatos de ésteres**. Esos lípidos mantienen anclado al polisacárido en la doble capa lipídica de la membrana mediante **interacciones hidrofóbicas**.

Cuando se extrae el polisacárido para preparar una vacuna bacteriana, el polisacárido se desconjuga y al purificarlo, aún pierde más sus propiedades inmunogénicas. En cambio, la formación de glicoconjugados de esos polisacáridos purificados, por **uniones covalentes** a distintas proteínas, exaltan la inmunogenicidad de los **epitopos activos**, y resuelven los problemas de inmunización de niños menores de dos años. El **fosfato de polirribosilo** (PRP), la cápsula del *haemophilus influenzae* tipo b invasivo, conjugada a las proteínas de la mem-

⁹⁴ McEvoy GK (1996) ed. *Pneumococcal vaccine, polyvalent*. En AHFS96. Drug 2483-2486 information. Bethesda: American Society of Health System Pharmacists.

brana externa del meningococo, o a los **toxoides del cólera**, o del tétanos, producen anticuerpos protectores frente al *H. influenzae* tipo b⁹⁵.

La inmunización con toxoides procedentes de **neumolisina** del *S. pneumoniae* ha creado ciertas expectativas de conseguir una vacuna conjugada eficaz contra la infección neumocócica⁹⁶, aunque parece que, como se ha observado en las tablas mostradas sobre la **actualización de la investigación de vacunas**, la vacunación con la proteína A, conferiría protección frente a varios serotipos del neumococo, lo que supondría un avance espectacular en la lucha contra esta infección que causa morbilidad y mortalidad muy altas⁹⁷.

Como la conjugación podría ocasionar algún trastorno tecnológico cuando se aplica a otros polisacáridos, puesto que en el caso de los antígenos linfocitos T-independientes, no inducen a la formación de IgG en roedores, las bases teóricas de la conjugación en vacunas tienen una limitación en la aplicación en humanos. Así, en los niños no es constante una respuesta inmunitaria hasta que tienen una edad de entre 6 y 8 meses, dependiendo, en parte, del tipo de conjugación utilizada. Parece como si esas **conjugaciones eficaces** reestabilizaran las conformaciones estructurales de el/los epítomos del polisacárido, de forma que estimulan a los **linfocitos B del niño pequeño**, con menor densidad de receptores.

No se conoce todavía el mecanismo por el cual se reestabilizan los epítomos y las conformaciones de los polisacáridos conjugados⁹⁸. El mismo polisacárido conjugado a diferentes proteínas, puede ser inmonogénico en unas poblaciones y menos en otras. La conjugación a una proteína determinada, puede favorecer la conformación de un polisacárido y deteriorar la de otro.

Aunque los conjugados de PRP parecen ser vacunas seguras y eficaces, sin embargo, existen casos de infecciones por **fallos de la vacunación** que puede haberse debido a que se consiguieron tasas de protección más bien bajas. La mencionada vacuna, previene de la enfermedad invasiva producida por la infección por el *H. influenzae* tipo b, pero esto no puede considerarse como evidencia de que la conjugación rompa siempre con la **tolerancia inmunológica** a los polisacáridos capsulares observada en los niños menores.

⁹⁵ Granoff y cols., 1992. Granoff DM, Anderson EL, Osterholm MT, Holmes SJ, McHugh JE, Belsh RB, Medley F, y Murphy TV, 1992 J Pediatr. 121:187-194).

⁹⁶ Alexander Je; Lock RS, Peeters CC, Poolman JT, Andrew PW, Mitchell et al.(1994). *Immunization of mice with pneumolysin toxoid confer a significant degree of protection against at least nine serotypes of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 62:5683-5688.

⁹⁷ Tart RC, Mac Daniel LS, Ralph BA, Briles DE. (1996). *Truncated Streptococcus pneumoniae PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice*. J Infect Dis. 173: 380-386.

⁹⁸ Santosham y cols. 1992. Santosham M, Rivin B, Wolff M, Reid R, Newcomer W, Letson GW, Almeida-hill J, Thompson C, and Siber GR. (1992) J Infect Dis 165 (suppl 1), S144-151.

La conjugación a proteínas estabiliza las conformaciones estructurales de los polisacáridos capsulares, y de esta forma se pueden mejorar sus inmunogenicidades.

Las vacunas de polisacáridos capsulares frente a los serogrupos A y C de meningococos, se desarrollaron para inmunizar a soldados, principalmente a los adultos jóvenes⁹⁹. Los sistemas inmunitarios de los niños pequeños no responden a los polisacáridos que contengan ácido siálico (grupos C, W, e Y), hasta que alcanza la edad de los 2 años. La pérdida de los grupos químicos α -2,9 siálico durante la infancia, corresponde con la capacidad de responder inmunológicamente a estas estructuras, como componente polisialílico de la cápsula de la membrana de la *Neisseria meningitidis* del Grupo C.

La *N. meningitidis* Grupo B comparte un enlace alfa-2-8 sialil-homopolímero del polisacárido capsular de la *E. coli* cepa K1. Esta estructura es también muy abundante en las células fetales humanas, y continua expresándose, aunque a menores concentraciones, a través de la vida. Por esta razón, el polisacárido bacteriano purificado únicamente rompe con la tolerancia biológica de una forma muy débil, y produce una pobre respuesta inmunitaria IgM, poco persistente en el tiempo.

Según Fukuda y colaboradores¹⁰⁰: **La conjugación a proteínas, no debería considerarse para los polisacáridos capsulares de las membranas celulares de los meningococos del Grupo C, y particularmente para el B, hasta que sus epítomos hayan sido estructuralmente conocidos, y distinguidos de las conformaciones estructurales primarias idénticas que glicosilan las células humanas durante la vida fetal y en la primera infancia.**

En la actualidad, se están desarrollando internacionalmente varios proyectos de investigación de vacunas antimeningocócicas, antineumocócica, y de otras bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*, grupo de Streptococo B, etc.), con numerosos glicoconjugados y con proteínas de la membrana externa, con la esperanza de disponer de medios mejorados de inmunización frente a los agentes causantes de estas infecciones¹⁰¹.

Las **proteínas de membrana externa** constituyen actualmente un grupo interesante de candidatos a vacunas, especialmente frente a las enfermedades causadas por bacterias gram-negativas. Este tema se tratará con la extensión debi-

⁹⁹ Artenstein MS, Brandt BL, Tramond EC, Branche, Jr, WC, Fleet HD, and Cohen RL, (1971) J Inf Dis 124:277-288.

¹⁰⁰ Fukuda MN, Dell A, Oates JE, y Fukuda M. (1985). J Biol Chem 260:6623-6631.

¹⁰¹ Poolman, 1995. Poolman JT, (1995), Development of a meningococcal vaccine, Infect Agents dis. 4:13-28.

da en la sección dedicada a Síntesis Peptídica y en la de vacunas DNA-recombinantes¹⁰².

5.7.3. Vacunas de lipooligosacáridos

Los Lipooligosacáridos bacterianos son glicolípidos. Moléculas triantennarias que estructuralmente se parecen mucho a los glicolípidos de las membranas celulares humanas¹⁰³. Los de cadenas más largas terminan en lacto-N-neotetraosa, que forman la **estructura básica** de las series de **paraglobósidos**, con propiedades **antigénicas sanguíneas**, o que se unen a los anticuerpos monoclonales considerados específicos para las estructuras terminales en **lacto-N-neotetraosa**.

Puesto que estos lipooligosacáridos son producidos por muchos patógenos de las mucosas humanas, constituyen, a primera vista, candidatos buenos para convertirse en vacunas; sin embargo, la **sialilación** de los glicoconjugados de la membrana celular humana inhibe su lisis, y el parecido que esas vacunas tendrían con estas estructuras, haría que las células humanas se desgastasen en una tarea inútil: Además, los lipooligopéptidos sialilados podrían inducir a reacciones de **autoinmunidad**.

Potencialmente es peligroso utilizar vacunas con estructuras de carbohidratos, pues aun en el caso de incluir estructuras de lacto-N-neotetraosa sialilados, existe el riesgo de que algunos de los vacunados presenten mielitis transversa, mielopatías, síndrome de encefalomielitis miálgica, y trastornos de desmielinación¹⁰⁴.

5.7.4. Vacunas de síntesis peptídica

Cuando se conoce la identidad de los antígenos protectores, las vacunas se pueden basar en preparaciones purificadas de esas moléculas. Desde hace algunos años, esta vía se ha seguido, en principio, en los casos de sustancias inmunógenas frente a la difteria, el tétanos y de otras infecciones, en donde la

¹⁰² Frontiers in Medicine: Vaccines, 1994, Sciences 265:1371-1404. Van der Ley, 1995. Van der Ley PA, Van der Biezen J, Poolman, 1995, construction of Neisseria meningitidis strains carrying multiple chromosomal copies of *porA* gene for use in the production of a multivalent outer vesicle vaccine, Vaccine, 13:401-407).

¹⁰³ Mandrell, 1992. Mandrell RE, McLaughlin R, Kwaik YA, Lesse AJ, Yamasaki R, Gibson B, Spinola SM, Apicella MA, 1992, Infect Immun 60: 1322-1328.

¹⁰⁴ Aavitsland, 1991. Aaisland P, Bjune G, Aasen S, Halvorsen, S. (1991) NIPH aNN 14:133-134.

patogénesis depende solamente de una proteína tóxica. Actualmente, más que utilizar la inactivación química para eliminar la toxicidad del antígeno clave, la tendencia es emplear la **destoxificación genética**, por mutagénesis dirigida a la estructura responsable del efecto indeseado. También, y siempre que es posible, se eligen proteínas no-tóxicas de **mutantes inducidos** al azar. Este es el caso de la proteína **CRM197** mutante, que antigénicamente es idéntica a la toxina diftérica nativa, pero que le falta la actividad de la base **adenosin-difosfato ribosil transferasa**.

Análogamente a lo referido sobre la **proteína CRM197**, la modificación genética de la subunidad S1 de la toxina pertussis, elimina su toxicidad, pero mantiene toda su capacidad antigénica. Asimismo, la supresión genética de las **cadeñas ligeras de las neurotoxinas del tétanos** o del *Clostridium botulinum*, elimina la actividad de **metalopeptidasa**, y produce proteínas no tóxicas que estimulan la formación de anticuerpos neutralizantes. La supresión de la **subunidad A de la toxina del cólera**, o de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, suprime la actividad enzimática ADP-ribosilante y la acción tóxica, pero los complejos de la subunidad B retienen la capacidad para estimular la protección inmunitaria, así como las respuestas a la acción de los **adyuvantes** sobre la mucosa.

Los **péptidos sintéticos** constituyen una **fuerza importante** de candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas¹⁰⁵. La investigación del comportamiento inmunológico de las estructuras peptídicas¹⁰⁶ se ha facilitado mucho al disponer de métodos modernos de química orgánica de síntesis de moléculas de péptidos¹⁰⁷, así como de **procedimientos de biosíntesis**.

Dentro de una molécula proteica, es posible identificar los epítomos que pueden inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, y de los epítomos que son *importantes* en las respuestas antigénicas de los linfocitos T.

Por esta vía, se ha podido estudiar profundamente la importancia de la composición de aminoácidos, y de las secuencias en la estructura molecular, para determinar su comportamiento estimulante de la respuesta inmunitaria¹⁰⁸. Así, ha sido posible disponer de nuevos acercamientos a la solución de los problemas planteados por la necesidad de investigar vacunas, tales como frente a la **tuberculosis pulmonar** en el adulto, o para prevenir **la lepra**, las infecciones por **Clamidia**, o por **Plasmodio**, para cuyos trabajos los métodos tradicionales no han producido resultados satisfactorios.

¹⁰⁵ Steward, 1987. Steward MW, (1987). Protective immune response elicits by synthetic peptides. Imm Today (1987), 8:51-58.

¹⁰⁶ Brown, 1990. Brown F (1990). *The potential of peptides as vaccines*. Semin Virol 1:67-74.

¹⁰⁷ Arnon R, and Horwitz RJ; (1992). *Synthetic peptides as vaccines*. Curr Opin Immunol, 4:449-453.

¹⁰⁸ Ada GL. (1993) Vaccines. En: Paul WE, ed. Fundamental immunology, 2nd ed. Raven Press, Ny, pg. 985-1032.

Los sueros antipéptidos podrían actuar de una de las siguientes maneras:

- a) **Como péptido inmunizante únicamente.**
- b) **Como péptido específico.** Con el péptido y con la proteína nativa sin competir con los anticuerpos generados frente a la proteína nativa.
- c) **Como péptido + proteína nativa,** pero que no compite con los anticuerpos generados por la proteína nativa. Es el caso de péptidos de determinantes específicos secuenciales.

5.7.4.1 PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS DE SÍNTESIS PEPTÍDICA

Las vacunas de síntesis peptídica constituyen un campo interesante de investigación de vacunas, debido principalmente a sus aspectos de moléculas seguras a un **costo** en general razonable.

Para iniciar un proyecto de investigación de vacunas de síntesis peptídica con probabilidades de éxito, se precisa disponer de unos conocimientos claves sobre los cuales basar su desarrollo como ya se ha visto a través de este estudio. De una forma resumida, estos conocimientos se reducen a los siguientes:

- a) En primer lugar, conocer cuáles son los **mecanismos celulares** responsables de la protección frente al agente patógeno.
- b) Descubrir cuáles son los **epítomos peptídicos** que se reconocen como responsables de la respuesta inmune.
- c) Investigar cómo se pueden administrar los epítomos peptídicos arriba mencionados, de forma que sean **inmunogénicos** para los componentes celulares del sistema inmunitario, así como que induzcan memoria inmunitaria en el componente adecuado del sistema.

En investigaciones relativamente recientes se han conseguido resultados aceptables aplicando los principios arriba enumerados, lo que hace esperar que las vacunas de síntesis peptídica podrían llegar a convertirse en temas de aplicación importante.

Es indudable, que la base racional, para establecer sobre ella una estrategia adecuada, consiste en reconocer e identificar a los **epítomos o determinantes antigénicos** eficaces para los linfocitos B y los linfocitos T respectivamente, o de dirigir por el camino correcto la respuesta inmunitaria de los linfocitos

citotóxicos, mediante el empleo de los **adyuvantes** mejorados de los que se dispone en este momento. Estos controlarán la respuesta en la vía que se desee, lo que constituye una base muy sólida para el trabajo de investigación ¹⁰⁹.

5.7.4.2. POSIBLE VENTAJAS DE LAS VACUNAS DE SÍNTESIS PEPTÍDICA

Las moléculas peptídicas poseen unas propiedades que les proporcionan, al menos, las siguientes ventajas:

- a) **Entidades químicamente definidas.** Se trata de moléculas sintéticas cuya composición responde a una fórmula química. Constituyen una fuente ilimitada de material.
- b) **Estructuras, en general, simplificadas,** que representan únicamente a los **epítomos** para los receptores de estímulo de los linfocitos B, o para los determinantes antigénicos de los linfocitos T.
- c) **Estructuras poliméricas** de construcciones multivalentes de asociaciones moleculares, que son más inmunógenas.
- d) **Fáciles de esterilizar,** y de conservar liofilizadas si fuera necesario.
- e) **Multiestimulantes del sistema inmunitario.** Se puede conseguir una estructura molecular de **unión de varios péptidos**, con propiedades distintas, tales como epítomos para linfocitos B y para determinantes antigénicos de linfocitos T.
- f) **No-infecciosas.** Se trata de moléculas que no contienen ácido nucleico, no tienen componentes de genoma alguno, ni de por sí mismas, ni procedente de las condiciones de obtención.
- g) **Simplificación.** La misma vacuna puede estimular respuestas de las clase-I y clase II del MHC-restringido de los linfocitos T.
- h) **Sin contener epítomos, ni determinantes antigénicos, que posean propiedades biológicamente indeseables,** tales como actividades supresoras de respuesta, ni **mimetismo molecular** con ninguna estructura del hospedador. Con ésto, se evita el posible riesgo de poder dar lugar a algún **trastorno de autoinmunidad.**

¹⁰⁹ Adams y col. 1995. Adams HP, and Kozoil JA, (1995). *Prediction of binding to MHC class I molecules.* J Immunol Meth. 185: 181-190. (1995). White WI, Cassatt DR, Madsen J, Burke SJ, Woods RM, Wassef NM, Alving CR, and Koenig S. (1995). *Antibody and cytotoxic T-lymphocyte response to a single liposome-associated peptide antigen.* Vaccine 13: 1111-1122.

Tampoco tiene posibilidades de inducir alguna respuesta exagerada de anticuerpos, como se produce en caso de hiperestímulo por infección.

- i) **Termoestabilidad** química de la molécula, y con probabilidades de ser también biológicamente estable.

5.7.4.3. POSIBLES INCONVENIENTES DE LAS VACUNAS DE SÍNTESIS PEPTÍDICA

Entre los posibles inconvenientes de las vacunas de síntesis peptídica, se pueden encontrar los siguientes:

- a) La **conformación** de la molécula biológica **natural** podría **condicionar la eficacia de una vacuna peptídica**. La molécula de una glicoproteína vírica recibe importantes influencias de su constituyente de naturaleza de carbohidrato .
- b) También por razones de **cambios conformacionales**, en el caso de un epítipo claramente lineal para linfocito B, la mutación de un solo aminoácido de la secuencia peptídica, podría afectar a la especificidad del epítipo.
- c) **Encarecimiento**. Cuando se requiere disponer de una vacuna que contenga muchos epítopos para un determinado linfocito B y además para varios determinantes antigénicos de linfocito T, el **costo de su producción** podría llegar a ser prohibitivo, pues no permitiría el acceso a campañas de inmunización promocionadas especialmente en los países faltos de recursos altos.
- d) Influencia de las **moléculas adyacentes**. La neutralización de los epítopos para los receptores de los linfocitos B por los péptidos sintéticos, en los casos de algunos virus tales como el de la influenza, la polio y de la inmunodeficiencia humana, es discontinua y exige la colaboración de las moléculas adyacentes al receptor para complementar la acción neutralizante.
- e) **Pérdida del poder neutralizante**. La forma estructural adoptada por el péptido sintético como molécula aislada, puede diferir, de una manera importante, de la conformación del epítipo neutralizante correspondiente para el linfocito B.
- f) **Vulnerabilidad de los enlaces peptídicos**. La degradación proteolítica puede tener lugar con mayor facilidad en uno o en más enlaces peptídicos de las moléculas sintéticas que en la proteína biológica, en donde los enlaces podrían estar más protegidos por **fuerzas conformacionales**, o por las cadenas laterales de los carbohidratos, que contribuyen a su estabilidad conformacional.

5.7.4.4. VÍAS ACTUALES DE INVESTIGACIÓN DE LAS VACUNAS DE SÍNTESIS PEPTÍDICA

Las tres vías principales de investigación de vacunas de síntesis peptídica son las siguientes actualmente:

- a) Ensayo de oligopéptidos y polipéptidos sintéticos.
- b) Preparación de anticuerpos antiidiotípicos.
- c) Manipulación del DNA por distintos procedimientos.

5.7.4.4.1. Desarrollo de péptidos

Para conseguir un candidato a vacuna por esta vía, inicialmente, se había procedido a la síntesis de oligopéptidos con la estructura esencial de la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente al agente infeccioso que se había mostrado inmunogénica. Aparentemente, **la estructura más sencilla** ofrecería la mayor ventaja por su sencillez. Sin embargo, la experimentación biológica de estas moléculas tan sencillas oligoméricas de subunidades, demostraron poseer propiedades **pobrementemente inmunogénicas**.

Las modificaciones de las técnicas básicas de acoplamiento de un péptido a una proteína, generalmente tienen el objetivo de mejorar la respuesta inmune. La exaltación de su inmunogenicidad se logró asociando varias copias de estos antígenos potenciales o epítomos, para los receptores de los linfocitos B, a las proteínas que pudieran actuar como portadoras y fuentes de determinantes de linfocitos T.

Se han empleado distintas proteínas, pero las correspondientes a los toxoides tetánico y diftérico, que poseen altos coeficientes **inmunogénicos**, y que muchos vacunandos ya han sido vacunados con ellos cumplen, por lo general, un papel importante al desarrollar una respuesta secundaria de los linfocitos-T.

Las modificaciones dirigidas al fortalecimiento de las respuestas inmunitarias pueden incluir las siguientes operaciones:

- a) La incorporación de epítomos para linfocitos Th dentro de la estructura del péptido sintético, o bien utilizar el péptido por sí mismo.
- b) **Ciclación del péptido** para mejorar su inmunogenicidad.
- c) Incorporación del péptido dentro de las **regiones antigénicas** de otras proteínas: de la fimbria bacteriana, del HBcAg, de la cápsida del po-

liovirus, etc. Estas últimas incorporaciones dentro del HBcAg, o de las cápsidas del poliovirus, mejor que dentro de otras proteínas, posee la ventaja de que al ser ellas mismas partículas muy inmunogénicas, facilitan el estímulo del sistema inmunitario para otros péptidos .

- d) La **polimerización de péptidos** contribuye al aumento de la inmunogenicidad de esta vacunas.

5.7.4.4.2. Desarrollo de lipopéptidos

Bessler y cols. (1985)¹¹⁰ y Hoffman y cols. (1987)¹¹¹ descubrieron que la parte N-terminal de la lipoproteína de la membrana externa de la *E. coli* es **mitogénica** (que estimula la proliferación) para los linfocitos B y para los **macrófagos**. Los lipopéptidos que poseen un N-terminal, el lipo-aminoácido tri-palmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (**Pam3CSS**), son capaces de inducir una potente respuesta de anticuerpos, cuando se los estimula *in vivo* por el virus -linfocito T citotóxico específico, induciendo memoria inmunitaria. En este caso, no se necesita la ayuda de ningún **adyuvante**.

Más tarde, se ha continuado investigando este fenómeno y se ha visto que diferentes modificaciones lipídicas de péptidos, como el ácido (-aminohexadecanoico, han demostrado que podrían facilitar la síntesis de lipopéptidos que contengan **múltiples epítomos**. De esta forma se originaría la estimulación simultánea de linfocitos B; linfocitos T, o de células T restringidas por diferentes **alelos** de MHC.

Esto último sería de gran utilidad para las vacunas de lipopéptidos en **poblaciones desnutridas**. El mecanismo exacto del comportamiento de este fenómeno no se conoce todavía, pero se supone que las características de las moléculas facilitan su difusión en los tejidos y el acceso a las distintas partes importantes del sistema inmunitario¹¹².

5.7.4.4.3. Desarrollo de vacunas anti-idiotipos

Los anticuerpos pueden actuar, por sí mismos, como **antígeno-inmunógenos**.

¹¹⁰ Bessler WG, Cox M, Lex A, Suhr B, Wiesmuller KPH, and Jung G, (1985). *Sinthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes.* *J Immunol* 135: 1900-1905.

¹¹¹ Hoffman P, Wiesmuller KH, Metzger J, and Bessler WG, (1989) *Induction of tumor cytotoxicity in murine bone marrow-derived macrophages by two synthetic lipopeptide analogues.* *Biol Chem Hoppe-Seyler* 370: 575-582.)

¹¹² Metzger y cols.,1993. Metzger JW, Sawyer WH, Wille B, Biesert L, Bessler WG, and Jung G. (1993) Interaction of immunologically-active lipopeptides with membranes. *Biochim Biophys Acta* 1149:29-39.

Se conoce como anti-idiotípica la respuesta inmunitaria frente al sitio único **antígeno-combinante** de un anticuerpo. Este segundo anticuerpo podría poseer una estructura semejante al antígeno original. Si así ocurriera, el anticuerpo anti-idiotípico, bien sea monoclonal o policlonal, debería ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria que reconociera al antígeno original y, consecuentemente, actuará como vacuna.

La imagen de espejo representa un **memótopo** natural como especificidad inmunológica pero no reproduce la estructura del **epítipo original**.

Este acercamiento al problema que se presenta con algunas vacunas convencionales, como las atenuadas o inactivadas, puede resolverse por este procedimiento.

La idea en que se basa este tipo de vacunas es que los anticuerpos, dirigidos contra los idiotipos se presentan sobre los anticuerpos (que son específicos para un antígeno particular), podrían ser utilizados como *imágenes de espejo* de los antígenos, con lo cual se estimula la inmunidad frente al antígeno que interesa ^{113, 114, 115}.

Los humanos generan alrededor de **100 millones de regiones hipervariables**, una distribución que permite abarcar numerosas especificidades y reconocer virtualmente todas las posibles conformaciones de moléculas biológicas.

Se piensa que las formas de las regiones hipervariables de los receptores Ig de los linfocitos B, o de las moléculas de Ig, deberían ser reconocidas por los otros anticuerpos, originando el complejo de una red en la cual se produce un equilibrio dinámico constante, mediado por las **interacciones idiotípicas**. Si se introduce un antígeno extraño, se perturbaría ese equilibrio. Jerne ¹¹⁶ propuso tres hipótesis importantes para explicar los fenómenos de **inmunomodulación**, a saber:

- a) El potencial del repertorio de los sitios de unión de un anticuerpo es mucho mayor que el repertorio disponible por el individuo. Esto explica el hecho de que un determinado Id es excepcionalmente raro en las preparaciones de globulinas de un suero normal.

¹¹³ Köhler H, Kaveri S, Kieber-Emmons T, Morrow WJW, Müller S, Raychaudhuri S, (1989). Overview of idiotypic networks and the nature of molecular mimicry. *Methods Enzymol* 178:3-35. (1989). Ada GL (1989) vaccines. En: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 2nd Ed. Raven Press, NY, pg. 1015. (1995).

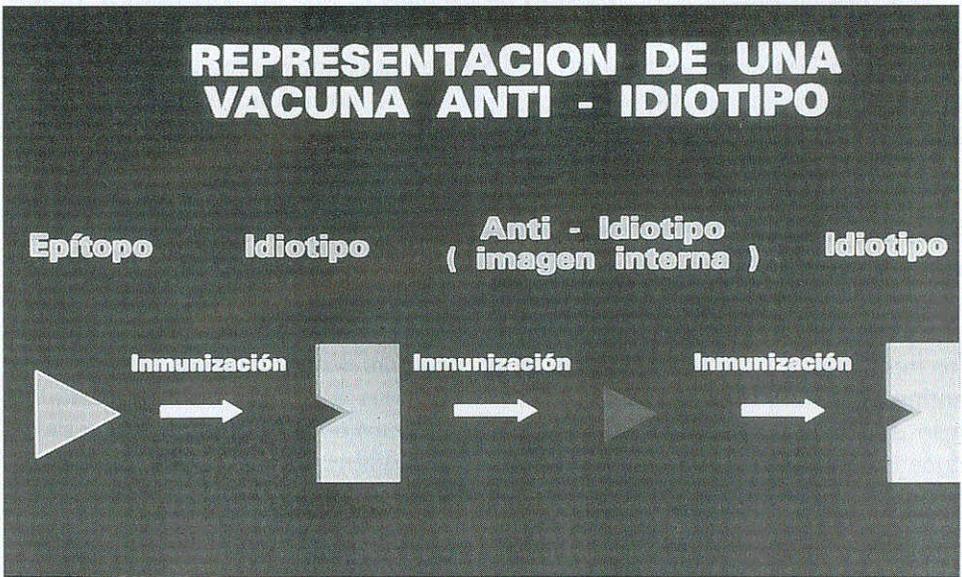
¹¹⁴ Köhler H, Kaveri S, Kieber-Emmons T, Morrow WJW, Müller S, Raychaudhuri S, (1989). Overview of idiotypic networks and the nature of molecular mimicry. *Methods Enzymol* 178:3-35. (1989). Ada GL. (1989) vaccines. En: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 2nd Ed. Raven Press, NY, pg. 1015. (1995).

¹¹⁵ Pan Y, Yuhasz SC, Amzel LM. (1995). Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *FASEB J* : 43-49).

¹¹⁶ Jerne (1974). *Immunol* 125c:373.

- b) El sistema inmunitario muestra un enorme **dualismo** entre el aumento (positivo) y la **supresión** (negativo) del comportamiento entre los linfocitos B y los linfocitos T. Además, las moléculas de los anticuerpos, pueden reconocer y ser reconocidas para inducir una respuesta anti-Id¹¹⁷.
- c) Finalmente, *el sistema inmunitario está regulado por una supresión de linfocitos*, siempre que esto es necesario.

Basándose en los tres principios fundamentales, Jerne propuso que el sistema inmunitario despliega una **autoregulación**, o comportamiento vía interacción de un **paratopos** en un Ab₂, con su correspondiente Id expresado en un Ab₁.



Durante la perturbación del equilibrio dinámico mencionado, Ab₁ es el anticuerpo que se forma en la primera fase. Este es el anticuerpo que reconoce a los **epítopos** del antígeno extraño introducido. Entonces se generan anticuerpos que reconocen al **idiotipo** Ab₁ de las moléculas. Puesto que el último posee múltiples idiotipos, los **anticuerpos complementarios** poseen estructuras heterogéneas desde los puntos de vista funcionales y estructurales, que se les suele caracterizar por la siguiente nomenclatura¹¹⁸:

¹¹⁷ Roth C, Roca-Serra J, Somme G, et al. (1985). The gene repertoire of the GAT antibodies in monoclonal antibodies produced after idiotypic immunization. Proc Natl Acad Sci USA 82:4788-4792.

¹¹⁸ Kohler H, Kaveri S, Kieber-Emmons T, et al. (1989). Methods Enzymol.178:3-35.

- a) Ab_{2a} , que reconoce la estructura básica-asociada y a los idiotipos reguladores.
- b) Ab_{2b} , que reconoce al idiotipo del paratopo (el sitio de unión al antígeno), posee una imagen interna del antígeno original, por lo cual debería funcionar como un antígeno (sustitutivo de los antígenos) frente a los agentes infecciosos.
- c) Ab_{2E} , que reconoce a los idiotipos de los **autoanticuerpos** y a los **epítomos** de los antígenos que se unen a los autoanticuerpos
- d) Ab_{2g} , que reconoce los sitios que combinan a los idiotipos asociados, pero que no llevan la imagen interna del antígeno

5.7.4.4.4. Cascada de idiotipos. Bases de la vacunación

Es comprensible que la imagen interna del anti-Id que **imita** estructural y funcionalmente un **epítomo** en el antígeno, puede inducir una respuesta inmunitaria identificadora del antígeno. Tanto este antígeno como el anti-Id presentan unas estructuras **complementarias** que producen unas respuestas Ab_1 y Ab_3 , respectivamente.

Jerner (1982)¹¹⁹ basó su teoría de la regulación inmunitaria en la existencia de la cascada de Id, consistente en que un hospedador sometido a la acción de un antígeno, producirá una respuesta de anticuerpos que dará lugar a la formación de Ab_1 que presenta dualidad funcional.

Por esta dualidad, el Ab_1 expresará un Id y tendrá especificidad antigénica. Se podrá utilizar para inducir activamente la producción de muchas clases de Ab_2 , cada una de las cuales reconocerá Ids distintos del Ab_1 . Por turnos cada población de Ab_2 puede ser utilizada para inducir activamente, muchas clases de Ab_3 .

Las poblaciones de Ab_3 se generan a través de la inmunización con Ids de una determinada preparación que podría ser distinta de sus Ids y de su especificidad antigénica, cuando se la compara con el Ab_1 . La cascada de Id podría regularse a través de los linfocitos *T-helper*, aumentando o suprimiendo sus correspondientes **acciones inmunitarias**.

Las estrategias vacunales con esta clase de vacunas consisten en regular las respuestas para conseguir la deseada, modificando aquellas cascadas de Id que dan origen al efecto perseguido.

¹¹⁹ Jerner NK, Roland J, and Cazenave PA. (1982). EMBO J 1:243-247.

5.7.4.4.5. Ventajas de las vacunas anti-id

Hay una serie de circunstancias, compartidas frecuentemente con las otras vacunas constituidas por subunidades antigénicas, en las cuales el empleo de vacunas anti-Id ofrecen posibilidades de seguir estrategias ventajosas. Estas son:

- a) Cuando la obtención del antígeno es un procedimiento difícil.
- b) Si las posibles vacunas atenuadas son genéticamente inestables, con frecuentes reversiones, o poseen genes oncogénicos.
- c) En los casos en que un **epítopo sencillo** puede conferir protección, pero otros epítopos de la molécula entera poseen riesgos de inducir trastornos de **autoinmunidad**.
- d) Cuando el germen despliega una diversidad genética amplia, pero tiene un solo receptor (la vacuna anti-Id, teóricamente, podría inducir una respuesta inmunitaria que **imitara al receptor** y se uniera al agente infeccioso en el sitio de fusión de ellos).

5.7.4.4.6. Inconvenientes de la vacuna anti-id

Entre los inconvenientes de la vacuna anti-id podemos señalar los siguientes:

- a) Las vacunas anti-Id, por poseer un **solo epítopo**, se dirigen a un solo receptor, que puede ser insuficiente para proteger frente a la infección.
- b) Existe la posibilidad de que, por sus múltiples usos, aumenten los títulos de anticuerpos **inmunoglobulina** determinantes de la región C y la formación de complejos antígeno-anticuerpo podría conducir a **trastornos patológicos**.

5.7.5. Vacunas DNA recombinantes

La tecnología de **ingeniería genética** del DNA-recombinante permite, en principio, preparar cualquier secuencia proteica, natural o imaginaria, en una gran variedad de sistemas *in vivo* (levaduras, **bacterias**, insectos, cultivos celulares de mamíferos). La **expresión de genes** que contienen la información adecuada para dar lugar a los **antígenos deseados** en cantidades suficientemente grandes ha mejorado mucho y permitido a los investigadores evaluar el potencial patogénico e inmunogénico de los componentes¹²⁰.

¹²⁰ Coa WI, Tartaglia J, Paoletti E, (1992), Poxvirus recombinant as live vaccines, Recombinant poxviruses. Binns MM and Smith GL. eds, 123-162. CRC Press, Boca Raton.

El proceso supone básicamente y brevemente, las siguientes operaciones:

- a) **Identificación de los dominios importantes** del gen del agente patógeno que sirvan a los propósitos de vacunación. Se basa en los estímulos de la presentación de una proteína antigénica a las células T;
- b) **Aislamiento y manipulación del gen elegido;**
- c) **Construcción del sistema de expresión;**
- d) **Organizar el crecimiento real del recombinante** y proceder al aislamiento del péptido o de la proteína antigénica.

Actualmente, es fácil que la proteína que se está considerando como inmunógeno se haya analizado ya al nivel de gen, y que la secuencia del DNA que la codifica haya sido clonada y determinado el orden en que se encuentran colocados las cuatro bases principales:

(A) **Adenina;** (G) **Guanina;** (C) **Citosina** y (T) **Timina.**

Es el procedimiento más rápido de predicción de la secuencia primaria en aminoácidos y que contribuirá también al conocimiento de cualquier precursor.

Durante las últimas décadas, los avances alcanzados por la biología molecular han conducido al desarrollo de técnicas altamente sofisticadas y métodos muy seguros de **ingeniería genética.**

Utilizando las normalmente disponibles, o las descubiertas recientemente frente a los distintos agentes infecciosos, existen posibilidades de preparar vacunas recombinantes o preparaciones químicas que mejoren las condiciones de inmunización y que permitan perfeccionar el control de enfermedades para las cuales aún no se dispone de medios eficaces.

Desde que se descubrió la posibilidad de **transferir material genético** extraño de una célula a otra¹²¹, por transducción de bacteriófago-mediador, quedó abierto un nuevo camino de investigaciones de vacunas innovadoras.

La posibilidad de transformar agentes patógenos en inmunizantes, con inmunogenicidades altas y seguridad total, ha sido siempre un objetivo de investigación muy perseguido y deseado, que se ha logrado con la tecnología del DNA-recombinante. La ingeniería genética con genomas RNA es algo más difícil, aunque también se han conseguido resultados brillantes. Por ejemplo, en el caso de los virus de la **poliomielitis** y de la **influenza**, respectivamente.

¹²¹ ZinderND, Lederberg J, (1952).Genetic change in *Salmonella*. J Bacteriol. 64:679-685

La modificación genética de las bacterias no ha sido difícil en el caso de que las cepas estudiadas crezcan bien, pero el trabajo es algo más problemático cuando se trata de bacterias que crecen lentamente como las *mycobacterias*.

Las recombinaciones entre homólogos se produce en una gran variedad de sistemas y se ha utilizado con numerosos microorganismos. Es esencial efectuar la fractura de dos regiones idénticas de moléculas de DNA y, a continuación, proceder al intercambio de fragmentos, uniéndolos en los puntos en los que se los había abierto. De esta forma, se consigue **intercambiar secuencias** entre los fragmentos de DNA de las moléculas mencionadas. La operación se puede realizar para conseguir la **exclusión** o la **inclusión** de determinados constituyentes dentro del genoma que se manipula.

Se construye un **plásmido** con la inclusión o exclusión deseada y este plásmido se introduce dentro del vector. En estos momentos, es relativamente fácil manipular en el laboratorio los genomas de muchos gérmenes patógenos, bien sea para atenuar sus virulencias o para utilizarlos como vehículos de **expresión de genes extraños**. Ambos casos pueden ser vías de preparación de vacunas.

5.7.5.1. ATENUACIÓN: VACUNA FRENTE AL CÓLERA

La capacidad para omitir segmentos específicos de bases de los ácidos nucleicos de los genomas se ha convertido en la práctica habitual de atenuar las cepas de los agentes infecciosos.

Conocemos los problemas mundiales ocasionados por la 7^a **pandemia de cólera** que, desde 1961, se ha ido extendiendo por muchos países de Asia oriental, África y América del sur. La O.M.S. solicita de todos los grupos de investigadores del mundo la atención imaginativa y técnica para que busquen una solución final del problema. Desde hace muchos años, se ha venido mejorando el tipo de vacuna utilizada en las distintas campañas anticólera^{122, 123}.

Por fin ahora¹²⁴, mediante múltiples **atenuaciones recombinantes**, se tiene la esperanza de que, en unos pocos años¹²⁵, se dispondrá de una vacuna por vía oral combinada, conteniendo varios determinantes antigénicos frente al

¹²² Levine MM, Kaper JB, Herrinton D et al. (1988) Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral catenciholera vaccine. *Lancet* 2 2:467-470.

¹²³ Tailor DN, Killeen KP, Hack DC, et al. (1994). Development of a live, oral attenuated vaccine against El Tor cholera. *J. Infect Dis* 170:15188-1523.

¹²⁴ Dougan, G. (1994). The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens-Implications for oral vaccine development. *Microbiology UK*, 140:215

¹²⁵ Costear TSE, Pillen KPH, Waldor MK, et al. (1995) Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated *Vibrio cholera* 0139 vaccine prototype. *Lancet* 345:949-952.

V. cholera, que cumplirá con los tres objetivos más importantes requeridos por las autoridades sanitarias internacionales:

- a) Marca la cepa de la vacuna, con el fin de distinguirla del tipo 01 del bacilo salvaje;
- b) Produce subunidades B de la **toxina del cólera**, con el fin de estimular inmunidad frente a este antígeno;
- c) Inactiva el gen de la **hemolisina**.

5.7.5.2. ATENUACIÓN DE SALMONELLA COMO PORTADORA DE ANTÍGENOS

La cepa de *salmonella* atenuada parece ser un buen candidato para la investigación de vacunas portadoras de antígenos clonados de otros microorganismos. La mayor parte de los trabajos se han realizado utilizando cepas de *S. typhimurium* por la facilidad de experimentación que ofrece el ratón. Las mencionadas cepas atraviesan el epitelio intestinal y la *lámina propia* se replica en el tejido linfóide y en las placas de Peyer, y entra en la circulación sanguínea a través de los vasos linfáticos. Entonces, tiene acceso al hígado y al bazo, donde se replica y extiende la infección que puede poner en peligro la vida del animal.

Parece demostrado que la respuesta inmunitaria está a cargo de los linfocitos T-CD4+ ¹²⁶. Gran parte de estos trabajos de experimentación animal son aplicables al género humano, basándose en la amplia experiencia obtenida con la utilización de la cepa atenuada TY-21, además, porque su administración oral estimula la formación de anticuerpos secretorios conjuntamente con la respuesta de inmunidad celular. Así, el gen de la subunidad B termolábil de la *E. coli* enterotóxica se introdujo dentro de la cepa atenuada Aro A de *salmonella*, y esta *salmonella* recombinante estimuló la producción de anticuerpos IgG y de IgA frente a la subunidad B enterotóxica y frente a la salmonella.

Se han realizado numerosos trabajos de investigación para desarrollar recombinantes de la *Salmonella typhimurinum* que expresarían antígenos extraños, o **epítomos** de esos antígenos:

- a) Con la **proteína HBcAg** como portador proteico en *salmonella*, e insertando otros epítomos de células B en ese portador, que puede adoptar la forma de partícula.
- b) Empleando numerosos plásmidos portadores de marcadores de resistencia a los **antibióticos** y un elemento promotor constitutivamente activo.

¹²⁶ Nauciel C. (1990). Role of CD4 T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. J Immunol 145:265-269.

Produciendo proteínas bacterianas recombinantes, utilizándolas como portadores de epítomos extraños. Por ejemplo, obteniendo **flagelina** de *salmonella*, la unidad monomérica de los flagelos que posee radicales carboxi y amínico muy bien conservados, pero también una región central hipervariable. Esta parte central, cuando se prepara o existe en la forma polimérica, lleva importantes epítomos de las células B que están expuestas al medio. En la mencionada región hipervariable, se han insertado largas secuencias provenientes de estructuras extrañas. Algunas de estas construcciones recombinantes han resultado inmunogénas por administración oral¹²⁷.

Se han conseguido inmunizaciones eficaces por administración oral al ratón frente a la infección letal por *Streptococcus pyogenes*, cuando se ha utilizado un plásmido con DNA que codifica la proteína M, en Aro A de la *Salmonella typhimurium*¹²⁸. El ratón produce IgA, IgM y sIgA, que opsonizan al *S. Pyogenes in vitro*.

Se ha desarrollado una vacuna potencialmente interesante que reconoce al HBsAg nativo, incorporando oligonucleótidos sintéticos que codifican para las secuencias del mencionado antígeno y, simultáneamente, para el antígeno de la fracción pre-S2, dentro del gen de una cepa de *Salmonella-flagelina-negativa*¹²⁹.

5.7.5.3. MEJORA DE LA INMUNOGENICIDAD DE VIRUS VACCINIA

Con el fin de conseguir una cepa segura e inmunogénica del virus *vaccinia*, se estudió profundamente y se determinó la secuencia estructural de las bases de ácido nucleico de la cepa Copenhague. Se encontró que el DNA contiene 191.636 pares de bases con potencial para codificar 198 lecturas del **genoma** (ORFs) de unos 65 o más aminoácidos¹³⁰.

El virus *vaccinia* tiene muchos genes que parecen estar comprometidos en controlar las respuestas de inmunidad innata e inducida por el virus. Tres de los genes se encargan de neutralizar los efectos antivirales de la gamma-

¹²⁷ Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. (1989). Site-directed mutagenesis of cloned DNA. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NY, pg.1-15. Parish CR, Wistar R, Ada GL, (1969) Cleavage of bacterial flagellin with cyanogenbromide antigenic properties of the protein fragments, Biochem J, 113:501-506.

¹²⁸ Poirer TP, Kehoe MA, Beachy, EH. (1988). Protective immunity provoked by oral administration of attenuated AroA *Salmonella typhimurium*, expressing cloned streptococcal M-protein. J Exp Med 168:25-32.

¹²⁹ Shodel F, Kelly SM, Peterson D et al. (1994). Development of recombinant *Salmonella* expressing hybrid hepatitis B core particles as candidate for oral vaccine. Dev Biol Stand 82:151-158

¹³⁰ Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, et al. (1990). the complete DNA sequence of vaccinia virus. Virology 179:247-266.

globulina y otros genes interfieren con las **fijación del complemento** y con el procesamiento de los antígenos, por los componentes del sistema MHC. La eliminación de ellos, obviamente, aumentará la inmunogenicidad de la vacuna. En el proceso de recombinación genética, entre otras cosas, se eliminaron minuciosamente 18 de los 65 ORFs mencionados, incluyendo algunas de replicación en determinadas líneas celulares humanas, pero no las de las células vero. El producto recombinante final, el NYVAC, ha demostrado retener un gran poder inmunogénico, haber perdido casi todas las posibilidades de patogenicidad, incluso para pacientes inmunodeficientes e inmunocomprometidos ¹³¹.

Con el virus atenuado de *vaccinia* también se ha logrado que, como vector vivo, mejore su capacidad inmunogénica expresando además **citoquinas** apropiadas, tales como **IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10**. Al menos la expresión de **IL-2** ha demostrado atenuar mucho la acción del virus, permitiendo inmunizar a inmunodeprimidos. La **coexpresión de IL-12** es interesante, pues esta interleucina posee actividad de **adyuvante**.

5.7.5.4. MEJORA DE LA ESTABILIDAD: VACUNA FRENTE A LA POLIO

La vacuna oral de la cepa atenuada de Sabin está constituida por los tipos I, II y III. De estos tres componentes, el tipo I es un virus muy estable y nunca presenta reversiones hacia las formas neurovirulentas. Por el contrario, y aunque con una frecuencia tan baja como de uno por millón, particularmente el tipo III y algo menos el tipo II, son virus que pueden volver a sus formas primitivas y causar la enfermedad paralizante. Por esta razón, la O.M.S. ha pedido que se dedique atención al mejoramiento de los principios antigénicos de la vacuna oral de Sabin.

Los estudios realizados sobre la estructura y la composición de la partícula viral están muy avanzados. Se ha comprobado que utilizando una tecnología corriente, se podría introducir una mutación dentro de cDNA y aislar un virus recombinante biológicamente más estable que los componentes del tipo III y del tipo II.

Se emplearía el virus tipo I como vector ¹³² de los **epítomos de los tipos menos estables** para que, manteniendo sus respectivas inmunogenicidades, perderían el riesgo de producir neurovirulencia ¹³³.

¹³¹ Lee SL, Ross JM, Mc Guigan LC, et al. (1992). Molecular attenuation of *vaccinia* virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* 66: 2617-2630.

¹³² Almond JW, and Burke KL. (1990). Poliovirus as a vector for the presentation of foreign antigens. *Sem Virof*, 1:11

¹³³ Andino JK, Silvera D, Suggett SD, Achacoso PL, Miller CJ, Baltimore D, and Feinberg. (1994) Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science*, 265:1448.

5.7.5.5. VACUNA RECOMBINANTE FRENTE A LA HEPATITIS B

Las técnicas más perfeccionadas de ingeniería genética disponibles hasta los momentos en que se realizaron las investigaciones, permitieron a los científicos de Smithkline Beecham desarrollar la primera vacuna humana obtenida por ingeniería genética, derivada de la levadura de cerveza (*Hansenula polymorpha*) genéticamente adaptada.

La partícula del HBsAg está constituida por una estructura macromolecular compleja compuesta por proteínas y lípidos. Esa partícula lipoproteica sin *core* tiene un diámetro medio de unos 22 nm. Posee tres proteínas de superficie, designadas como larga (M), media (L) y pequeña (S), respectivamente. La proteína S es el péptido más importante, codificado por la región S del genoma del virus y se presenta bajo dos formas: monoglicosilada (P24, GP27); y **no-glicosilada** (P24). La obtención de este antígeno en fermentaciones de levadura da lugar a la forma no-glicosilada; la que se obtiene en cultivos celulares de *hámster* chino se origina en forma glicosilada. Ambas partículas son muy similares en tamaño, forma ultramicroscópica y composición. La respuesta humoral a la inyección subcutánea en el ratón también es similar. Sin embargo, la respuesta de los linfocitos T-citotóxico es más alta en el caso del antígeno obtenido por fermentación de las células de levadura¹³⁴.

Las fases principales de la investigación de la vacuna antihepatitis B recombinante se resumen en el siguiente esquema:

El **gen-S** del virus de la hepatitis B (VHB), había sido identificado como el responsable de la codificación del **antígeno de superficie** HBsAg, llamado antiguamente antígeno de Australia¹³⁵.

Utilizando técnicas corrientes de ingeniería genética, el gen-S puede ser aislado, cortado, trasladado e insertado en un huésped alternativo y adecuado. De esta forma, el microorganismo elegido produce cantidades rentables de HBsAg.

El huésped seleccionado lo ha sido de una manera muy racional, pues se conoce mucho sobre su comportamiento bioquímico, genético y su fermentación industrial, al haberse empleado durante siglos en la fabricación de la cerveza.

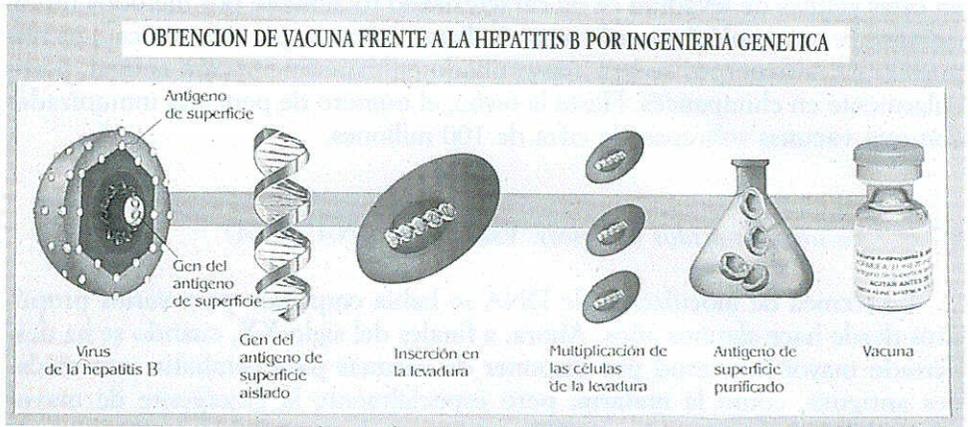
Puede ser fermentado a altas densidades celulares en un medio nutritivo o substrato, sintético simple y bien definido, sin riesgos de producir **endotoxinas** perjudiciales¹³⁶.

¹³⁴ Diminsky D, Schimbeck R, Reimann J and Barenholz J. (1995), *Vaccine*, 15:637-647.

¹³⁵ Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, and Hall BD, Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* (1982), 298:347-350.

¹³⁶ De Wilde M, Cabezón T, Harford H, Tutgers T, Simoen E, and van Wiinendaele F, (1983). Production in yeast of hepatitis B surface antigen by r-DNA technology. *Dev Biol Standards*, 59:99.

1. Mediante la colaboración con el profesor J. Desmyter, de la Universidad de Lovaina (Bélgica) se consiguieron sueros de un portador crónico del VHB humano.
2. A partir de este suero¹³⁷ se procedió a la extracción y purificación del virus de la hepatitis B.
3. Se extrajo el DNA viral y se clonó dentro de *Escherichia coli* en un **plásmido vector** de expresión. Este paso crucial permitió la obtención de suficiente cantidad de DNA viral para posteriores manipulaciones genéticas.



4. Mediante un procedimiento de etapas múltiples a partir del DNA viral clonado, se aisló el gen-S y se fusionó a la secuencia que controla la expresión en levadura (**promotor TDH3**), incorporándose a un plásmido de expresión que contenía los componentes necesarios para la replicación y para el mantenimiento de la cepa preparada de la levadura de cerveza acomodada al proceso de fabricación. El **plásmido** de expresión final, designado por **PRIT12.363**, se introdujo entonces en las células de *Saccharomyces cerevisiae* mediante transformación citoplasmática. De esta forma, las células transformadas producen **HBsAg**. El PRIT12363 contiene únicamente un fragmento mínimo de DNA viral, el indispensable para la especificación de los 226 aminoácidos de la molécula proteica del antígeno. La cepa del huésped y el plásmido de expresión, están ampliamente estudiados y caracterizados para asegurarse la estabilidad y fidelidad de la expresión del HBsAg en condiciones de fermentación industrial.

¹³⁷ (Desmyter J. Hepatitis B vaccines: past, present, and future (abstract), Postgraduate Med J (1987) 63(suppl.2),57:

El método de producción de la vacuna está basado en el empleo del sistema de lotes de semillas. Por este procedimiento, la población de células homogéneas de levadura recombinante se divide en un número determinado de receptáculos que son almacenados bajo condiciones controladas en un medio estable. A ellas se les denomina *semilla principal*. Estas células de levadura, a su vez, pueden diluirse en el líquido adecuado y subdividirse de nuevo dentro de las *semillas de trabajo*. Se denominan SKRIT4376. Estas pueden permanecer almacenadas a -70 °C, durante muchos años, y se utilizan como fuentes de suministro de levaduras para la producción de HBsAg a escala comercial.

El antígeno de la vacuna antihepatitis B obtenida por ingeniería genética en estas células de levadura se ha caracterizado totalmente por métodos físico-químicos e inmunológicos, así como mediante microscopía electrónica. Las respuestas de anticuerpos se han comprobado en experimentación animal, particularmente en chimpancés. Hasta la fecha, el número de personas inmunizadas con esta vacunas sobrepasa la cifra de 100 millones.

5.7.6. *Vacunas de ácidos nucleicos. Vacunas de DNA (RNA)*

La técnica de inoculación de DNA se había empleado para varios propósitos desde hace algunos años. Ahora, a finales del siglo XX, cuando se ha despertado mayor inquietud por disponer de vacunas para combatir enfermedades antiguas, como la **malaria**, pero especialmente la emergente de mayor inquietud, la **infección por el VIH**, parece que la posibilidad de disponer de un procedimiento más bien simple se ha recibido con mucho entusiasmo científico.

Las vacunas de ácido nucleico por inoculación directa de nanogramos de proteínas (mil-millonésima de gramo; de 100 a 1000 veces menor que el contenido de una vacuna de virus inactivados), expresarán la producción de antígenos dentro de las células del individuo vacunado y, consecuentemente, generarán anticuerpos, linfocitos T citotóxicos y respuestas inmunitarias protectoras. Suponen la utilización de la tecnología de DNA-recombinante para la **clonación de genes** que codifican la proteína, o las proteínas genéticamente responsables del antígeno, o de los antígenos que se desean emplear en la inmunización. Se los incluye en un plásmido adecuado para su **transcripción y expresión**. El plásmido, constituido por el DNA y un promotor adecuado, se hace crecer en cultivos celulares, generalmente bacterianos, y se purifica. La vacunación se realiza por **inoculación directa del DNA (RNA)** incluido en el plásmido, que sirve de vector muy dinámico en el **citósol celular**. Para poder penetrar la membrana celular, cuando se emplea la piel, se utiliza la **pistola de genes** que acelera balísticamente la partícula.

En la mayor parte de las vacunaciones con DNA, la inoculación se realiza en la piel o en el músculo, alguna vez también se pueden efectuar administraciones de cantidades mínimas por vía endovenosa. La expresión del gen se efectúa en las células musculares o **miocitos, a través de las miofibrillas**, o en los **queratinocitos** de la piel, que originan antígenos nacientes con estructuras exactamente coincidentes con los naturales. En esencia, el plásmido del DNA, transcribe y traduce por **vía citoplasmática**, de forma que los componentes más importantes de la respuesta inmunitaria específica generan de una manera muy eficiente linfocitos CD4+Th y **CD8+ linfocitos citotóxicos**, tal como sucede cuando se inocula virus o bacterias atenuadas, bien directamente, o a través de **vectores**¹³⁸.

Parece comprobarse que, cuando la administración del DNA se efectúa inyectándolo en forma de una solución salina en el **músculo**, se estimularía la respuesta del **linfocito Th1**, la actuación de gamma interferón y de IL-2, con activación de **macrófagos** y producción de **opsonización**; los tipos de anticuerpos generados son C'-dependientes e IgG2a, IgG2b.

Por otro lado, la inoculación en la **piel** a través de pistola de genes, genera preferentemente la activación de linfocitos cooperadores de tipo **Th₂**, con producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL10; los anticuerpos que aparecen son de los tipos C'-independiente, IgG1 e IgE. Se origina un aumento de la cifra de **eosinófilos**, respuesta de sensibilidad de las mucosas y un control de la actividad fagocitaria¹³⁹.

Muchos proyectos de investigación sobre vacunas de ácido nucleico están dedicados a estudiar los parámetros fundamentales de esta tecnología tan potente. Entre ellos se encuentran algunos tales como los **mecanismos de presentación del antígeno**¹⁴⁰; las respuestas inmunitarias inducidas, la correlación entre las respuestas y las protecciones del sistema inmunitario, la posología, las vías de administración y las dosis necesarias que entran dentro de las claves más importantes para valorar la trascendencia del avance tecnológico¹⁴¹.

Se necesita disponer de **vacunas mejoradas** y de vacunas nuevas de extraordinaria importancia sanitaria que, utilizando las técnicas actuales, no se han podido descubrir y para cuyas disponibilidades de obtención a través de los procedimientos genéticos, las vacunas de DNA podrían tener probablemente soluciones brillantes.

¹³⁸ McDonell WM, Askari FK. (1995). Molecular medicine. DNA vaccines. N Engl J Med 334:42-45.

¹³⁹ Barry MA and Johnston SA. (1997). *Biological features of genetic immunization*. Vaccine, 15,8:788-791. Barry MA and Johnston SA. (1997). *Biological features of genetic immunization*. Vaccine, 15,8:788-791.

¹⁴⁰ Robinson HL. *Nucleic acid vaccines: an overview*. (1997). Vaccine 15,8:185-187.

¹⁴¹ Aguado MT, Bazin H, Rabinovich R, Smith H, and Vogel, *International meeting on nucleic acid vaccines for the prevention of infectious diseases*. (1997). Vaccine, 15:vii-viii.

Durante los últimos cinco años, se han celebrado varias reuniones científicas, dos de las cuales han sido convocadas por la O.M.S. exclusivamente para valorar la importancia y las responsabilidades de sus utilizaciones¹⁴².

Muchos de los estudios de seguridad se han realizado, y continúan realizándose^{143, 144}, basándose en experimentación animal, especialmente con ratones y en otros animales pequeños, pero varios candidatos para convertirse en vacunas se están ensayando en primates no humanos y algunas muy seleccionadas en ensayo clínico en hospitales especializados.

Toda la información que se va generando como consecuencia de los mencionados estudios constituirá la base necesaria para ampliar o no la investigación y la esperanza de conseguir aplicaciones prácticas de mucho interés, no solo relativo a la seguridad de las vacunas producidas utilizando las nuevas tecnologías, sino también sobre la calidad y la cantidad de la respuesta inmunitaria generada.

Las vacunas genéticas que utilizan un plásmido de DNA que codifica el gen del antígeno, o antígenos, presentan la gran ventaja de ser portadoras de la información que se le proporciona al cuerpo para que él mismo fabrique el antígeno con su propia capacidad biológica, sin la introducción de efectos indeseables de la entrada de ningún agente infeccioso patogénico. Al menos teóricamente, representan el acercamiento más íntimo a la infección natural, sin los efectos secundarios que esta conlleva.

5.7.6.1. POSIBLES VENTAJAS DE LAS VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Entre las posibles ventajas que presentan las vacunas de ácidos nucleicos podemos resaltar las siguientes:

- a) **Inducción de respuesta inmunitaria humoral y celular.** Al parecer, si se estudia adecuadamente el régimen posológico, el número de dosis y la vía de administración, podría conseguirse *confeccionar* la respuesta inmunitaria deseada.
- b) Para numerosos antígenos, sería el **método de vacunación preferido** para conseguir la **inmunización efectiva** y para lograr la respuesta máxima de la dosis de recuerdo.

¹⁴² World Health Organization. (1994). Proceeding of WHO meeting on nucleic acid vaccines. *Vaccine* 12:1491-1568.

¹⁴³ Kennedy RC, Shearer MH and Hildebrand W. (1997). *Non-human primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity.* *Vaccine*, 15,8:903-908.

¹⁴⁴ European Commission, the Food and Drug Administration, the National Institutes of Allergy and Infectious diseases and the World Health Organization. *Special Conference Issue International meeting on nucleicAcis Vaccines for the Prevention of infectious diseases.* 15,8: 785-935.

- c) Debería funcionar también en los casos de sistema inmunitario inmaduro, así como evitar las interferencias que ofrecen los antígenos maternos.
- d) Desde un enfoque práctico, las vacunas genéticas ofrecen la posibilidad de combinar antígenos procedentes del mismo o de diferentes gémenes patógenos de forma fácil, o aún más, de administrar conjuntamente inmunomoduladores.
- e) Se facilitan las técnicas de fabricación y se mejoran las estabilidades.

5.7.6.2. POSIBLES DESVENTAJAS DE LAS VACUNAS DE ACIDOS NUCLEICOS

Teóricamente, existe la posible integración cromosómica o la tolerancia inducida por el gen. Afortunadamente, hasta este momento, las comprobaciones y estudios realizados son negativos en este aspecto.

5.8. Investigaciones de adyuvantes en vacunas

Desde 1925¹⁴⁵, se han utilizado **adyuvantes** para aumentar la respuesta inmunitaria de los antígenos en experimentación inmunológica¹⁴⁶. Desde entonces, se han multiplicado los proyectos de investigación del grupo de sustancias, especialmente en la búsqueda de las bases moleculares donde sustentan su modo de acción. Pero aunque los adyuvantes se han venido utilizando durante tantas décadas, apenas se conoce algo sobre su modo de acción. La lista de sustancias adyuvantes es muy abundante, pero entre una y otras, poseen muy poco puntos comunes con respecto a sus estructuras químicas, o a las circunstancias en que desarrollan la activación de algunas de las células que componen el sistema inmunitario.

Actualmente, los adyuvantes han recibido mucho mayor atención porque:

- a) Las vacunas sintéticas y las subunidades antigénicas, muy purificadas, son escasamente inmunogénicas y **necesitan adyuvantes** para despertar la respuesta protectora que se requiera;
- b) La **modulación selectiva** de la respuesta inmunitaria por adyuvantes, con relación a los complejos principales de histocompatibilidad (MHCs), de las clases I y II, y de los linfocitos T cooperadores (Th), de los tipo Th₁ y Th₂ que juegan un papel importante en la protección frente a las infecciones causadas por patógenos intracelulares, tales como virus, bacterias y parásitos.

¹⁴⁵ Ramon G. (1926). Procédres pour acroitre la production des antotoxines. Ann Institut Pasteur. 40:1-10.

¹⁴⁶ Ramon G. (1995). Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique, Bull Soc Ceantr Med Vet. 101:227-234.

La mayor parte de las veces, el objetivo del empleo de adyuvantes está en convertir antígenos poco inmunogénicos en vacunas protectoras. Las moléculas o los complejos de adyuvantes mejoran la presentación física de las moléculas del antígeno para potenciar sus propiedades inmunógenas. El efecto adyuvante de una sustancia, en términos de respuestas inmunitarias obtenidas con él, como regla general, no puede extrapolarse a otros antígenos.

Formulación con adyuvante (inmunoestimulante + vehículo)

Ejemplos de vacunas que requerirán/beneficiarán con los nuevos adyuvantes:

- V Herpes simple
- Citomegalovirus
- V.R. Sincital
- VIH
- V. de Epstein Barr
- Gripe (*influenza*)
- Hepatitis B
- Tuberculosis
- Vacunas terapéuticas.
- Vacunas frente al cáncer.

El término de formulación con adyuvante se utiliza ampliamente para la vacuna con **inducción deseada, selectiva de la respuesta inmunitaria**. Aunque en la bibliografía se describen numerosos adyuvantes. Su modo de acción ha permanecido empírico y misterioso por falta de conocimientos técnicos. La primera vez que se utilizó este tipo de agente¹⁴⁷ se deseaba mejorar la eficacia inmunológica de las vacunas.

Es muy importante investigar su actuación a niveles biológicos y clasificarlos de acuerdo con estas características, lo que facilitaría la elección en cada caso. Los beneficios que se generarían se pueden resumir en lo siguiente:

- a) Cuando se conociera la patogénesis de la enfermedad, se podría elegir un adyuvante que facilitara la formulación de una vacuna, que estimule la respuesta inmunitaria protectora deseada;

¹⁴⁷ Glenny AT, Pope CG, Waddington H, and Wallace U, (1826). Immunological notes-J Path Bact. 29:38-39

- b) Cuando no se conociera ni la patogénesis a la que dá lugar el germen **patógeno**, ni la respuesta inmunitaria originada, la investigación de la formulación incluiría una franja de adyuvantes que se sospeche que produce reforzamientos diversos de la respuesta inmunitaria para poder empezar a seleccionar, racionalmente, los que son más importantes;
- c) Cuando los conocimientos que se posean pudieran utilizarse para combinar varios adyuvantes, con el fin de lograr los diferentes efectos que se desean conseguir.

5.8.1. *Propiedades de los adyuvantes*

Como para las vacunas, la prioridad máxima de todo adyuvante consiste en ser seguro. La sustancia que se utilice como adyuvante no puede ser ni **cancerogénico**, ni teratogénico, ni **abortogénico**. Debería no dar lugar a hipersensibilidad, fiebre, ni producir necrosis local, ni **granulomas**, ni desarrollar **efectos autoinmunes**. Debería evitarse el empleo de adyuvantes que pudieran producir **efectos inespecíficos** en la célula. Sería conveniente que se tratara de una sustancia biodegradable, **de corta vida media**. Por otra parte, es muy importante la especificidad. La actividad de los adyuvantes tiene que estar dirigida hacia células específicas del sistema inmunitario, porque la mayor parte de los signos de activación podrían ser transducidos por la **fosfolipasa** de la membrana. Sería conveniente que se conociera su **estructura molecular**.

Existen otras condiciones para que haya una respuesta inmunitaria efectiva: las células del sistema inmunitario han de yuxtaponerse con el antígeno de una manera correcta. La acumulación de células que son capaces de reconocer al antígeno es un prerequisite para una iniciación satisfactoria de la respuesta inmunitaria. La inyección de **sales de aluminio** da lugar a una **hipercelularidad** y a un aumento de volumen paracortical del nódulo linfoide. Esto se debe a un incremento del influjo de linfocitos, desde el aparato circulatorio, denominado «**trampa de linfocitos**», creyéndose que es probable que esto constituya un componente del «*modus operandi*» del adyuvante¹⁴⁸. Los **macrófagos** y los linfocitos T se cree que median en los intercambios de los linfocitos y la interleuquina-1 (IL-1) y que son responsables de la **retención celular**. Se podría deber a la adherencia molecular que daría lugar a un aumento de la capacidad de los linfocitos para unirse a las células endoteliales¹⁴⁹.

¹⁴⁸ Dresde DW, Taub RN, and Krautz AR. (1970). The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph node 11: circulating lymphocytes. *Immunol.* 18:663-670

¹⁴⁹ Vadas MA, Gamble JR and Smith WB. (1992). regulation of myeloid blood cell endothelial interaction by cytokines. In *Adhesion. Its role in inflammatory disease*. De. by Harland JM and Liu DY. WH Freeman and company NY pg 65-81.

Otras propiedades deseables, tales como que los adyuvantes fueran sustancias de fácil manipulación en la fabricación de vacunas; moléculas con buena estabilidad a largo plazo; que se presentaran como **partículas multiméricas**, que facilitarían su fagocitosis.

La presentación física del antígeno dentro de la vacunas, incluye la estabilización estructural y la **exposición del epítipo nativo** conformacionalmente, así como la capacidad que el adyuvante posea para formular el antígeno en pequeñas partículas o agregados, preferentemente solubles y, si fuera posible, que por algún mecanismo el antígeno estuviera contenido en una estructura multimérica organizada.

5.8.2. *Inmunomodulación ejercida por adyuvantes*

Los adyuvantes son, por lo general, moléculas relativamente pequeñas que modifican el **comportamiento de las citoquinas**, que aumentan la respuesta inmunitaria, que ejercen una selección entre los Th_1 y Th_2 . La potenciación/modulación que incluye actividades que regulan los aspectos cuali-cuantitativos resultantes de las respuestas inmunitarias. Estas actividades pueden suponer también la **circulación intracelular del antígeno**, su **procesamiento proteolítico**, su asociación con las moléculas de los complejos MHC-I y MHC-II, así como la expansión de los linfocitos T, con distintos perfiles de producción de citoquinas. A los adyuvantes se les pide que modifiquen la actuación de las citoquinas. En general, los adyuvantes estimulan las acciones de un grupo de citoquinas mientras que deprimen las correspondientes al otro grupo¹⁵⁰. Dos series importantes Th de linfocitos T.CD4+, por ejemplo Th_1 y Th_2 se han descubierto sin ninguna duda. **La respuesta de los linfocitos Th_1 es típicamente de estímulo de la fijación del complemento al anticuerpo y de fuerte hipersensibilidad.** Su actuación, como se ha mencionado en otros apartados, está asociada a las **acciones inmunomoduladoras** del IFN- γ , e IL-2. Por otra parte, **las respuestas de los linfocitos Th_2 resultan de altos niveles de anticuerpos secretores, frecuencia de IgE, y de citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 y posiblemente, de IL-10.** Las respuestas Th_1 y Th_2 se inhiben unas a las otras.

La respuesta inmunitaria nunca oscila totalmenete a un lado o al otro. Probablemente, las sales de aluminio son las que actúan de una forma más radical, pues se inclinan hasta más del 90% hacia las respuestas del linfocito Th_2 ¹⁵¹, así

¹⁵⁰ Romagnani S. (1991). Human Th_1 and Th_2 subsets:doubt no more.Immunol Today, 12:256- 257.

¹⁵¹ Mancino D,Ovary Z. (1980). Adjuvant effects of amorphous silica and aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strain.Int Arch Allergy Appl Immun. 61:253-258

como las de las **endotoxinas** bacterianas y derivados como son el lípido A, monofosforil lípido A¹⁵².

Las sales de aluminio son las que constituyen el único adyuvante autorizado universalmente por las distintas autoridades sanitarias.

Especialmente los **eosinófilos** son atraídos por este adyuvante. Después de la inyección se forma un depósito coloidal que engloba al antígeno¹⁵³. Puede activarse el complemento y se originaría el estímulo para la localización del antígeno, por las células dendríticas foliculares y se mejoraría la memoria inmunitaria por los linfocitos B.

La adecuada elección del adyuvante, no sólo aumenta la respuesta inmunitaria, sino que también determina el isotipo de IgG.

5.8.3. *Presentación del antígeno por adyuvantes*

Son generalmente moléculas **anfipáticas** (hidrofílico, hidrofóbico) o complejos moleculares que interactúan con los **inmunógenos** en su conformación nativa. Aumentan cuantitativamente la respuesta de **anticuerpos neutralizantes** y prolongan su duración. Una de las propiedades de los buenos adyuvantes consiste en preservar la **integridad de la estructura del epítipo** del antígeno para que no sufra ningún deterioro y pueda ser presentado de forma eficaz a las **células profesionales efectoras** del sistema inmunitario (**APCs, antígeno presenting cells**), constituidas principalmente por las células **dendríticas**, y las **células de Langerhans**; posiblemente también por los macrófagos¹⁵⁴, aunque esta función no está suficientemente aclarada para estas células, hasta el momento, para lograr una respuesta eficaz de anticuerpos. El antígeno se acopla al receptor por **endocitosis**; o por ingestión de líquidos o de partículas muy pequeñas a partir de la formación de vesículas endocelulares o **pinocitosis**¹⁵⁵, en fase líquida. El **endosoma** que resulta se funde con un lisosoma para dar lugar a un **endolisosoma**. Entoces es cuando ha llegado el momento de que las células dendríticas, probablemente estimuladas por el GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), se dirijan hacia una zona de drenaje de un **nódulo linfático** o al bazo para iniciar el **proceso de presentación**. Se procesa al antígeno en pequeñas **porciones peptídicas**, para que entonces tengan

¹⁵² Johnson AG and Tomai MA. (1990). A Study of the cellular and molecular mediators of the adjuvant action of a nontoxic monophosphoryl lipid A. *Adv Exp Med Biol*. 256:567-579.

¹⁵³ White RG Cons AH, Connolly JM, (1995). Studies on antibody production. III. The Allum granuloma. *J Exp Med* 102:73.

¹⁵⁴ Brewer JM, Richmond J, and Alexander J. (1994). The demonstration of an essential role for macrophages in the in vivo generation of IgG2a antibodies. *Clin Exp Immunol*, 97:164-171

¹⁵⁵ Lanzavecchia (1990) A, Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to das 11 -restricted T lymphocytes. *A Rev Immunol*, 8:773-793

ocasión de establecer contacto físico con las moléculas del MHC clase II, que se encuentran en el **retículo endoplásmico**. Se transporta al complejo molecular resultante a la superficie de la célula efectora APC, en donde se presenta al antígeno conjuntamente con el MHC-II¹⁵⁶.

Una de las funciones inmunomoduladoras que ejercerá el adyuvante consistirá en estimular al APC para que segregue IL-1, que atraerá linfocitos T.CD4+.

Los linfocitos T, con receptores complementarios al complejo péptido MHC, procederán a su correspondiente expansión clonal. Es posible que en este momento se decida el balance del equilibrio de la fracción Th₁/Th₂ y, entonces, el adyuvante debe jugar el papel que se espera de él. Por otra parte, la segunda interacción corresponde al reconocimiento entre el **antígeno y el linfocito B**. Se inicia porque la superficie de la inmunoglobulina y el antígeno se unen¹⁵⁷, luego el antígeno-mediado se interioriza por **endocitosis** a través del receptor de la Ig. Se le digiere en un **endolisosoma** y los péptidos resultantes, asociados al MHC-II son expresados de nuevo en la superficie del linfocito B. Para entonces, las serie de linfocitos T capaces de reconocer el complejo antígeno-MHC-II han experimentado sus correspondientes expansiones clonales y se encuentran en condiciones de cooperar y de dirigir a los linfocitos B, para que clonalmente se expandan y transformen en células plasmáticas, que excreten inmunoglobulina de la misma especificidad de la Ig sobre la superficie de la célula B inicial. Además, el cambio de **citoquinas** también contribuirán en la producción de **isotipo de anticuerpo**.

La relación antígeno/anticuerpo y su distribución, que cubre una franja amplia que incluye la liberación lenta del antígeno desde una zona de depósito en el sitio de la inyección, iniciación de la respuesta inmunitaria a través de la **atracción** del número suficiente de **células presentadoras** y realización de otras actividades que conduzcan a aumentar el consumo de antígeno, y su transporte hacia los órganos linfáticos más relevantes, constituye una de las varias actividades que el adyuvante puede ejercer.

5.8.4. *Inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos por los adyuvantes*

Estos adyuvantes que inducen respuestas de linfocitos T citotóxicos son partículas que pueden unirse o incluir inmunógenos y que, en medios emulsionantes de características agua/lípido, se fusionan con las membranas celulares o las rompen para soldar péptidos a la **cubierta celular** que contenga moléculas de

¹⁵⁶ Neefies JJ, and momburg F. (1993). Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin immu.* 5:27-34.

¹⁵⁷ Cambier JC, Pleiman CM, and ClarkmR. (1994). Signal transduction by B cell antigen receptor and its coreceptor. *A Rev Immu*,12:, 457-486.

MHC-I. **Proceso citosólico**, vía endógena que produce proteínas de péptidos de correcta clase I (el citosol contiene muchas proteínas y enzimas solubles activas que intervienen en este proceso). Generalmente, esta inducción requiere que el antígeno, previamente, haya sido procesado dentro del citosol celular, donde los péptidos se incorporan al «**guante cerrado**» de la molécula de complejo MHC-clase-I y, entonces, se expresa. La mayoría de las proteínas que atraviesan el complejo salen convertidas en péptidos que, posteriormente, son procesadas por **exopeptidasas**, hasta transformarlas en aminoácidos. Pero una pequeña proporción de moléculas peptídicas compatibles son seleccionadas y transportadas por otras proteínas especializadas hasta incorporarlas a los receptores del complejo MHC-I y, a través del **órgano de Golgi**, hacerlas visibles en la superficie de las células presentadoras. Parece verosímil que el fenómeno está modulado por **citoquinas** vigilantes y controladoras de que se cumplan determinadas especificidades¹⁵⁸. Durante muchos años se observó que los virus inactivados podían sensibilizar a las células para que se produjera la lisis, en ausencia absoluta de síntesis proteica, y se considera que era un argumento a favor de la idea de que el antígeno intacto se uniera para formar un complejo antígeno-moléculas del MHC para formar el **ligando** que los linfocitos citotóxicos pueden reconocer. Más tarde, cuando se conoció la importancia de la vía citoplasmática en las interacciones de péptidos con moléculas de los complejos MHC, se constató que los antígenos extraños de un lisosoma dentro del **citoplasma** podrían emerger si se cumplen ciertas condiciones de la especificidad del sistema inmunitario¹⁵⁹.

A la hora de la elección del adyuvante más adecuado para lograr la inducción de formación de linfocitos citotóxicos, conviene concentrarse en los aspectos de facilidad de **incorporación o persistencia del péptido** apropiado dentro del MHC-I. El método más eficaz para seleccionar un adyuvante que interactúe entre las membranas y los antígenos es buscar que el adyuvante se deposite dentro del citosol de forma activa para que se produzca el procesamiento en el **proteosoma**. Este fenómeno se puede originar por **fusión con la membrana externa** o, como previamente se ha mencionado, por **endocitosis/pinocitosis**, seguido por **fusión membranal endosómica** o por ruptura (**escape endosómico**) de un inmunomodulador dentro de la formulación con adyuvante, especialmente alguno que induzca la producción de IFN- γ . Podría esperarse que este adyuvante aumente la expresión relevante del péptido-MHC-I, aunque la mayor parte de las células expresan el complejo MHC-I. La célula diana más efectiva para la inducción del linfocito T citotóxico es la célula presentadora de antígeno (APC) y que con mejor rendimiento se consiga, probablemente, llegar a las **células dendríticas**¹⁶⁰.

¹⁵⁸ Pike B. I(1992). Cytokines acting on B lymphocytes. En Roitt MI, Delbes PJ eds. Encydedpetya of immunilogy. Acad Press NY pg.440-441

¹⁵⁹ Braciale TJ, Yap KL. (1978). Role of viral infectivity in the induction of influenza virus-specific cytotoxic T cells. J Exp Med 147:1236-1252

¹⁶⁰ Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, and Askonas BA, (1989). Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. J Exp Med 169: 1255-1264).

Las emulsiones de aceites minerales y agua, generalmente, son adyuvantes de elección, pues originan respuestas altamente inmunogénicas con presencia de linfocitos citotóxicos, aunque tiene el inconvenientes de provocar algunas reacciones secundarias ¹⁶¹.

La emulsión de tipo agua en aceite puede dar lugar a efectos secundarios en el sitio de inyección y reacciones **granulomatosas**. Un mecanismo alternativo de la **inducción de linfocito T citotóxico** está constituido por el contacto directo del péptido para vaciar el complejo MHC-I, expuesto externamente. Esto se ha conseguido con formulaciones especiales de emulsiones agua/lípido; en la fase acuosa se encuentran los péptidos y una proteína reconocida universalmente, p-e- (toxoides tetánico) ¹⁶². Se supone que la mencionada emulsión crea un depósito que atraerá células dendríticas y, al mismo tiempo, protege al péptido de la proteólisis. El toxoide tetánico y derivados, estimula a las células dendríticas para que emigren hacia los tejidos linfoides y, mientras se realiza la presentación de los péptidos asociados al toxoide tetánico, se atraerá a los linfocitos T entre los cuales se encontrarán algunos **linfocitos T.CD8+**, que reconocen al péptido original del linfocitos citotóxico. Otra actuación sobre los determinantes antigénicos de los linfocitos T citotóxicos puede realizarse a través de un vector quimérico ¹⁶³. Los **linfocitos T citotóxicos** podrían actuar sobre la base de un mismo MHC.

5.8.5. *Investigación de los modos de acción de los adyuvantes*

Algunos adyuvantes particulares se unen directamente a los inmunógenos. Hay adyuvantes que saturan las células de Kupffer en el hígado ¹⁶⁴. Esto constituye una forma eficiente de utilización del conjunto de **adyuvantes e inmunógenos**. Los adyuvantes con naturaleza de carbohidratos tienen la propiedad de dirigirse hacia los receptores de la **lectina**, sustancia con semejanzas con los anticuerpos, que se muestra sobre las superficies de los macrófagos y sobre las de las células **dendríticas**. Definen el potencial de avides que puede poseer un adyuvante, de presentación de antígeno, de depositar el inmunógeno precisamente en las células inmunitarias efectoras, generalmente por vía de esas mismas células.

¹⁶¹ Schulz M, Zinkernagel RM and Hengartner H. (1991). Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. Proc Ntl Acad Sci USA. 88:991-993

¹⁶² Scalzo AA, Elliot SL, Cox J, Gardner J, Moss DJ, and Suhrbier A. (1995). Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant. J V rol. 69:1306-1309

¹⁶³ Scalzo AA, Elliot SL, Cox J, Gardner J, Moss DJ, and Suhrbier A. (1995). Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant. J V rol. 69:1306-1309

¹⁶⁴ Bradfield JWB, Souhami RL, and Addison E. (1974). The mechanism of the adjuvant effect of dextran sulphate. Immunology, 26:383-392

La actividad de estos adyuvantes puede que no produzca ninguna modificación del tipo de respuesta inmunitaria. Lo que significaría es más bien un efecto cuantitativo. El efecto puede ser más específico sobre los macrófagos que sobre las células dendríticas, o lo contrario. Cuando se produce una depleción (pérdida excesiva) de macrófagos, se podría originar un cambio radical hacia respuestas de tipo Th₂.

La forma más común de interactuar con el antígeno está en formar **agregados multimoleculares**. Los adyuvantes con esta propiedad entran dentro del grupo de adyuvantes de partículas. Las partículas de 1-10 milimicrones, se pueden administrar por vía oral.

Las posibilidades de estimular, bien sea a los macrófagos, a las células dendríticas o a las células de Langerhans, definen la **especificidad selectiva** del adyuvante y el tipo de respuesta inmunitaria que puede modular.

5.8.6. *Investigación del control de la liberación de antígenos por adyuvantes*

Desde hace pocos años se ha dedicado un esfuerzo considerable al desarrollo de vacunas de **liberación controlada del antígeno**¹⁶⁵. La acción de liberación controlada o de "Depot", se consigue, generalmente, a relativamente corto plazo con gran eficacia empleando sales de aluminio o emulsiones agua/lípidos, pues el antígeno queda atrapado en el sitio de inyección y no puede ser eliminado por funciones fisiológicas. Cuando se requiere prolongar la potencia de una sola dosis durante un largo periodo de tiempo, como de 1 a 4 meses, la solución más adecuada la presenta el empleo de polímeros sintéticos **biodegradables**, tales como el **coglicólido de poliactida**, que da origen a **microesferas** o **nanoesferas** de tamaño mayor de 10 milimicrones, para que puedan permanecer en el sitio de la inyección hasta que alguna célula presentadora de antígeno lleguen a actuar sobre ellas^{166, 167}.

5.9. Las Citoquinas

Las citoquinas son, generalmente, moléculas de glicoproteínas con un gran poder de potenciación del procesamiento del antígeno por los sistemas de los complejos MHC.

¹⁶⁵ Eldridge JH, Staa JK, Meulbroek JA, Tice TR, and Gilley RM. (1991). Biodegradable and bio-compatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microsphere as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect immun.* 59:2978-2986

¹⁶⁶ Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staa JK, Gilley RM and Tice TR. (1990). Controlled vaccine release in the gut associated lymphoid tissue. *J control release.* 11:205-214

¹⁶⁷ Gupta, Varanelli CI, Griffin P, Wallach, DFH, and Siber GR. (1995). Adjuvant properties of non-phospholipid liposomes in experimental animals for human vaccine antigens (in press). (1997). Cox JC, and Coulter AR. Adjuvants, a classification and review of their modes of action. 15:248-256.

Constituyen una clase especial de adyuvantes porque cooperan en la liberación del antígeno en el sitio en que el linfocito actúa, y ejercen una serie de acciones de potenciación, especialmente en los casos de subunidades antigénicas y de las vacunas de ácidos nucleicos.

El objetivo de administrar citoquinas como adyuvantes de las vacunas está en aumentar o en modular las respuestas inmunitarias suministrando los **signos intracelulares o mensajeros** que normalmente se producirían en la respuesta inmunitaria, pero mejorando a la naturaleza en el sentido de que esos signos aparezcan antes y a mayores concentraciones, o en un sitio o localización atípico, donde, para lograr respuesta inmunitaria, sea conveniente su presencia.

El sistema inmunitario está constituido por diferentes tipos de células, cada uno con sus funciones específicas, dirigidas a la defensa del individuo¹⁶⁸. Las distintas clases de células y en las diferentes localizaciones, interaccionan, bien por contacto de célula a célula, o bien a través del uso de sustancias solubles o citoquinas¹⁶⁹.

Los macrófagos normalmente originan la **IL-12**, que induce a los linfocitos NK a que produzcan **interferón** (γ), dirigiendo la respuesta inmunitaria hacia el fenotipo TH1¹⁷⁰

Temas relacionados con este apartado de citoquinas, han sido tratados en las sesiones correspondientes a: 3.4.- **La Respuesta inmunitaria**; 3.5.- **La fagocitosis**, 3.6.- **Algunas funciones del Interferón- γ** ; 4.1.- **Linfocitos responsables de las respuestas de inmunidad adquirida.**

5.10. Los Liposomas

Los liposomas son moléculas con propiedades físicas muy distintas. Se pueden emplear para potenciar la actividad inmunógena de un antígeno, pero también para resolver los defectos de respuesta inmunitaria, por factores genéticos, en individuo no respondedor.

Se fabrican utilizando distintas composiciones lipídicas con el fin de imprimirles las propiedades físico-químicas y biológicas que más convenga a la vacuna que se está investigando. Es claro que al variar sus componentes se varían sus comportamientos, adaptándolas a las que se requieran en cada caso.

¹⁶⁸ Alwan WH, Record FM, and Openshaw PJM. (1995) *Phenotypic and functional Characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins.* J Immunol 150:5211-5218

¹⁶⁹ Vogel FR and Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. En Powell M and Newman (eds). *Vaccine Design: The Subunit and adjuvant Approach* Plenum Press. N.Y. 1995, pg.141-228.

¹⁷⁰ Afonso LC, Scharton TM, Vieira m, Trinchieri G and Scott. (1994). Administration of recombinant IL-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263:235-237.

Sus formas similares a las vesículas de las membrana de los microorganismos, con diámetros que varían entre los 20 nm a 3 μ m, pueden estar conformadas por una o múltiples capas y contienen colesterol y fosfolípidos. Se utilizan especialmente, cuando el inmunógeno tiene tendencia a unirse a las membranas (moléculas **lipofílicas y anfipáticas**, es decir molécula asimétrica, con un extremo hidrofílico y el otro hidrofóbico), incluyéndolo entre los espacios intermembranales, especialmente si se trata de moléculas de inmunógeno con propiedades hidrofílicas. Los liposomas se han empleado especialmente como adyuvantes de formulaciones de vacunas de administración oral¹⁷¹.

Está demostrado que los liposomas constituyen un grupo de adyuvantes muy eficaces en la presentación al sistema inmunitario. Sin embargo, se ha comprobado también que por sí mismo no afectan ni a la potenciación ni a la modulación de la respuesta inmunitaria, y que necesitan de la actuación suplementaria de los **inmunomoduladores**¹⁷².

5.11. Micropartículas poliméricas degradables

Como se ha comentado repetidamente a lo largo de este estudio, en las últimas décadas la investigación de agentes inmunógenos en las vacunas ha tomado unas vías de preferencia que en resumen son:

- a) El empleo de subunidades recombinantes;
- b) Síntesis peptídica de epítomos importantes del patógeno;
- c) Vacunas de ácidos nucleicos.

Aunque se ha comprobado que estas vacunas ofrecen ventajas significativas frente a las tradicionales, la desventaja más importante consiste en poseer inmunogenicidades empobrecidas generalmente por la simplicidad de sus moléculas. Consecuentemente, de una forma paralela, se ha originado un movimiento de investigación, concentrado en conseguir adyuvantes eficaces que potencien la propiedad inmunogénica de las vacunas, además de favorecer la distribución del antígeno, para contribuir al éxito de conseguir inmunidades protectoras eficaces más persistentes.

Se sabe que las sales de aluminio son los únicos adyuvantes aprobados por las autoridades sanitarias internacionales. Indudablemente, son adyuvantes muy

¹⁷¹ Powers DC, Manning MC, Hanscome PJ, Pietrobon PJF. (1995). Cytotoxic-T-lymphocyte responses to a liposome-adjuvanted influenza A virus vaccine in elderly adults. *J Infect Dis* 172: 1103-1107.

¹⁷² Kersten GFA and Crommelin DJA. (1995). Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. *Biochim Biophys Acta* 1241:117-138.

seguros, pero se ha demostrado que son débiles en la inducción de producción de anticuerpos y en el desarrollo de inmunidad celular¹⁷³.

Se han obtenido buenos resultados utilizando mezclas de determinados adyuvantes prestándose mucho a esto los liposomas¹⁷⁴. También asociando las subunidades antigénicas con varias micropartículas poliméricas¹⁷⁵. La eficacia de las micropartículas parece que se relaciona con la facilidad que ofrezcan para que los **macrófagos** las fagociten.

Los derivados de los **poli-láctido-co-glicólidos** (PLGs), por ser polímeros biocompatibles y biodegradables, han ofrecido grandes ventajas¹⁷⁶.

La **prevención total** de la infección, lo que se puede denominar “inmunidad esterilizante” o ausencia total de riesgo, se puede conseguir con respuestas inmunitarias elevadas y de duración prolongada.

Los factores que afectan al elevado título de anticuerpos se pueden controlar con sistemas de liberación continua de antígenos, a través de una vacuna preparada con **microesferas poliméricas**¹⁷⁷.

5.12. Vacunas terapéuticas

Cuando se llegue a disponer de medios adecuado para estimular al sistema inmunitario de forma que proporciones la respuesta deseada, la ciencia inmunológica se acercará al concepto que se desea tener de una vacuna: “**Un agente que proteja al sistema inmunitario de tal forma, que este pueda evitar con mayor eficacia la enfermedad y recuperar la salud de la persona**”.

Las bases para desarrollar estas vacunas se encuentran continuamente en la biología humana. El sistema inmunitario, en la práctica, cura muchísimas enfermedades con los medios de que dispone, sin ningún apoyo del desarrollo científico. Con cierta frecuencia se presentan casos de niños infectados al nacer por el VIH, con marcadores positivos, que aclaran del virus. Sus sistemas inmunitarios han sido capaces de curarles. Otras muchas in-

¹⁷³ Bengtsson KL and Sjölander A. (1996). Adjuvant activity of ISCOMS; effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant Vaccine, 14: 753-760

¹⁷⁴ Schutz N; Qrart R; Chen D; Zeleninch-Jacquotte A; Abcles G; and Bystryr JC (1995). Effect of Detox as an adjuvant for melanoma. Vaccine 13: 503-508

¹⁷⁵ O'Hagan DT. (1994). Microparticles as oral vaccines, in Novel delivery Systems for Oral Vaccines (O'Hagan DT ed; CRC Press) Pg. 175-205.

¹⁷⁶ Ecdrige JH; Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing in antibodies. Infect. Immun 59: pg. 2978-2986.

¹⁷⁷ Clealand JL; Lim A; Barron L; Duenas ET; and Powell MF; (1996); Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1: Part 4; J.

fecciones curan por sí mismas, únicamente proporcionando **protección nutricional**, estado de reposo, apoyo psicológico, elementos que fortalecen al sistema inmunitario ¹⁷⁸, etc.

También se sabe que, a pesar de haberse sufrido la inoculación del agente patógeno, por ejemplo el *Clostridium tetani* o el virus de la rabia, la inmunización específica frente al microorganismo, tiene probabilidades de actuar a favor de que el posible enfermo, recupere el estado de salud.

5.12.1. Vacunas frente a las células neoplásicas

Los tumores se producen por **alteración en la expresión de uno o de varios genes que regulan el crecimiento y/o la diferenciación celular**. Las causas son atribuibles a factores químicos, físicos y por algunos virus.

Se ha demostrado que las defensas en el individuo, normalmente, son insuficientes para paralizar el desarrollo y la diseminación del tumor.

La **inmunoterapia para controlar el desarrollo de tumores** se viene ejerciendo desde hace por lo menos veinte años ¹⁷⁹. En esta vía de investigación, se han ensayado vacunas preparadas con células enteras, oncolisados celulares o principios antigénicos procedentes de tumores benignos y malignos.

En pacientes con cáncer en estado avanzado, al tratarles con citoquinas estimulantes del sistema inmunitario ¹⁸⁰, se han conseguido resultados clínicos espectaculares.

Algunos investigadores ¹⁸¹ piensan que una vacuna estimulante de la secreción de citoquina IL-2 podría utilizarse como inmunoterapia del cáncer.

Muchos pacientes de melanomas han sido tratados con vacunas preparadas con componentes celulares supuestamente antigénicos. Los resultados, hasta el momento, son muy variables, pero parece que mejora, al menos, su **supervivencia** ¹⁸².

¹⁷⁸ Spinney L. (1995). *Poor diets breed deadly viruses*. New Scientist 146:16

¹⁷⁹ Thomas L. (1959). En Lawrence HS, ed. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive state. Hoeber-Harper, New York, 529-532.

¹⁸⁰ Rosenberg SA; Hotze MT; Muul LM et al. (1987). Progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high doses of interleukin-2 alone. New Eng J Med 316: pg 889-897.

¹⁸¹ Santin AD; Ioli GR; Hiserodt JC Et al. Development Pharm sci.

¹⁸² Harris J; Ryan L; Adams G et al (1994). Survival and relapse in adjuvant autologous tumor vaccinotherapy for Dukes B and C colon cancer-EST-5283. Proc. Am Soc Clin Oncol 13: 294.

Los antígenos asociados a los tumores que se reconocen como **linfocitos T-CD-8 citotóxicos**, se consideran como posibles candidatos a vacunas¹⁸³.

Se resuelve el problema de inmunogenicidad baja de las células **cancerosas**, aportando un complejo celular peptídico extraño al organismo humano¹⁸⁴.

La combinación de **factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (MM-CSF)** con **interleuquina-4 (IL-4)**, intensifica la inmunidad anti-tumor en el **cáncer cerebral murino**¹⁸⁵.

Las vacunas que combinan los principios antigénicos del cancer embrional con el virus *vaccinia* recombinante e interleuquina 2 mejoran las situaciones clínicas¹⁸⁶.

La vacunación con vacunas anti-idiotipo puede producir inmunidad celular y humoral en sistemas de modelos animales, pero aún se necesitan muchos trabajos de investigación para averiguar las causas de los fallos vacunales.

Finalmente, aunque desde el principio de este estudio se ha llamado la atención sobre las bases de la investigación de vacunas que sean eficaces, es evidente que **el desafío más importante de estos proyectos no solo está en la identificación correcta de los componentes inmunogénicos de los patógenos causantes de la infección, sino también en comprender, lo mejor que sea posible, la etiopatogénesis de ellos.**

El objetivo mencionado es alcanzable siempre que se logre entender como se origina y regula la respuesta inmunitarias, y cual es el punto del sistema que necesita estimulación precisa para que se desencadena la protección frente al patógeno específico.

Para que una molécula determinada de adyuvante ayude al sistema inmunitario, tiene que actuar en alguna de sus células.

Las identificaciones de las respuestas Th_1 , Th_2 , Th_0 y el efecto de desviación que las diferentes citoquinas pueden ejercer, indican claramente que el adyuvante en toda formulación de vacunas, debe estimular la célula del sistema inmunitario que sea la específica para desarrollar la cascada de citoquinas adecuada.

¹⁸³ Bronte V.; Tsung K.; Rao JB, et al. (1995). IL-2 enhances the function of recombinant poxivirus vaccines in treatment of established pulmonary metastases. J Immunol 154: pg 5282-5293

¹⁸⁴ Birnstiel Ml.(1996) *Transloading tumor cells with a foreign peptide, generates a potent immune response.* Proc Nat Acad of Sci 93:9759-63.

¹⁸⁵ Hamada H. (1996). *Dual cytokine cancer vaccine intensifies antitumor immunity.* Vac Wkly June 10.

¹⁸⁶ McLaughlin JP, Schlom J, Kantor JA, et al. (1996). *Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2.* Can Res 56: 2361-2367.

Además, la activación debe producirse en el tiempo correcto y en la magnitud apropiada. Cualquier desviación de este programa podría conducir a conseguir una respuesta reducida, o lo que es más serio, una respuesta perjudicial.

Por eso se necesita investigar mucho sobre si la inmunidad humoral o la celular es la más importante para eliminar la acción de un patógeno determinado, pero también si algunas de las respuestas tiene algún riesgo de producir inmunopatología.

Si se consigue **caracterizar bien la constelación de citoquinas y las cinéticas de las respuestas inmunitarias**, sería posible dirigir la respuesta inmunitaria de forma que se pudiera modificar el curso de la infección de muchos patógenos.

**CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO
EN LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA**

del Excmo. Sr. D. DAVID MARTÍN HERNÁNDEZ

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO

EXCMO. SR. D. LEÓN VILLANÚA FUNGAIRIÑO

Excmo. Señor Director,
Excmos. Señoras y Señores Académicos,
Señoras y Señores

La Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia acordó el 18 de septiembre; designarme para dar la bienvenida como Académico de número de esta corporación al Excmo. Dr. D. David Martín Hernández. Reconozco, por supuesto, el honor y la responsabilidad que representa dicha designación.

Me une una sincera amistad con el Doctor David Martín, y acepto con alegría la empresa que se me encomienda. Con la ayuda de Dios y la indulgencia del Docto auditorio, reflejaré en unos minutos mis apreciaciones sobre el nuevo académico de número, como es costumbre en estos actos.

* * *

FORMACIÓN ACADÉMICO-PROFESIONAL (3 y 5)

Estudió el Bachillerato Universitario en Las Palmas de Gran Canaria con notas de sobresalientes, alcanzando la calificación de Notable en el Examen de Estado en la Universidad de La Laguna (Tenerife). En 1947 obtuvo el Título de Maestro de Primera Enseñanza en la Escuela de Magisterio de Las Palmas de Gran Canaria.

Posteriormente, se trasladó a la Universidad de Barcelona, en cuya Facultad de Farmacia obtuvo el Grado de Licenciado el 20 de Junio de 1951, con la calificación de Sobresaliente y Premio Extraordinario. Una vez graduado, trabajó en diversos laboratorios de la Facultad, iniciándose en diferentes tareas de investigación, especialmente con el profesor Moreno Martín, que le nombró Profesor Ayudante de Análisis Químico y Bromatología; también trabajó con los profesores Gastón de Iriarte (E.) de Microbiología, Larralde (J.), de Fisiología. En la Cátedra de Química Orgánica, con los profesores Marquina, Pulido y Hernández-Gutiérrez, con quienes participó como coinventor en las pri-

meras patentes españolas sobre los métodos de síntesis del ácido para-amino salicílico y de otras moléculas del grupo.

Durante su estancia en Barcelona, trabajó asimismo como analista del Hospital Clínico de Barcelona (Laboratorios de Análisis Bioquímico de la Facultad de Medicina, 1948).

Se trasladó a Madrid, para realizar estudios de Doctorado en la Facultad de Farmacia, Cátedra de Bioquímica, equipo de G. de la Fuente de la Universidad Complutense. Como Director de Tesis figuró el Excmo. Prof., y actualmente Presidente honorífico de esta Real Academia de Farmacia, Don Ángel Santos Ruiz. El 12 de diciembre de 1955, ante el Tribunal correspondiente, leyó su trabajo de investigación titulado “*Acción de los Antibióticos sobre algunos Sistemas Enzimáticos*”, habiendo obtenido la calificación de Sobresaliente y recibido el Premio de Doctorado de la *Fundación Valdecilla*.

Su formación académico-profesional terminó con la obtención de los títulos de Especialista en Análisis Clínicos y Biológicos (20/01/54), y de *Farmacéutico Especialista en Farmacia Hospitalaria* expedido por el *Ministerio de Educación y Ciencia* (21/04/87).

LABOR PROFESIONAL E INVESTIGADORA (3 y 5)

Nada más terminar su licenciatura (03/10/51), ingresó por oposición en el Cuerpo de **Farmacia Militar**, con el número 1 de su promoción. En este cuerpo estuvo destinado en Madrid, desempeñando varios cargos. Recibió la Cruz del Mérito Militar de Primera clase, con distintivo blanco por servicios farmacéuticos distinguidos.

Siendo Capitán Jefe de Análisis Clínicos de la 1ª Región Militar y habiendo realizado el curso de aptitud para su ascenso a Comandante Farmacéutico, pasó a la situación de supernumerario, para marchar a la Universidad de Cambridge.

Independientemente de su faceta militar, nuestro nuevo académico, conservando su vocación científica e investigadora, en el año de 1952 fue llamado para participar en trabajos que realizaba el Dr. J.L. Rodríguez-Candela en el Instituto “Gregorio Marañón” del C.S.I.C sobre insulina y acciones de agentes hipoglucemiantes. En este Centro, recibe una beca de la “Fundación Juan March” para continuar estudios bioquímicos sobre el mencionado tema de investigación con el Director del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge (Reino Unido) Prof. F.G. Young. Allí tuvo la oportunidad de conocer y trabajar con los Premios No-

bel Frederick **Sanger** (descubridor de las estructuras de las moléculas de las insulinas, y Cesar **Milstein** (obtención de monoclonales), pudiendo actualizarse en las más modernas teorías, metodologías y proyectos de investigación científica.

Su estancia en Inglaterra le sirvió para consolidar su formación. Su esposa le ayudó mucho en los trabajos de laboratorio porque el prof. Young, enterándose de que ella trabajaba en el mismo Centro del C.S.I.C., permitió su incorporación al proyecto que se estaba realizando.

Desde 1952 que ganó por oposición el ingreso como Farmacéutico Adjunto de la Beneficencia de la Diputación Provincial de Madrid hasta 1985, fecha en que pasó a la situación de excedente, ha desarrollado variados cometidos en esta institución, que actualmente depende de la Consejería de Sanidad del Gobierno Autónomo de la Comunidad de Madrid.

El Dr. Martín Hernández, ingresó en el Cuerpo de Farmacéuticos Titulares en 1956. En 1971 fue invitado por la entonces Dirección General de Sanidad, para coordinar la instalación de los nuevos **centros técnicos** (Farmacobiología y Alimentación y Nutrición) **de Majadahonda**.

En 1955, el Dr. David Martín tuvo la primera responsabilidad en la Industria Farmacéutica como Director Técnico de los Laboratorios Rapide.

En 1963 fue nombrado Director de Investigación y Desarrollo Farmacéutico de Pfizer en España, lo que le supuso recibir formación investigadora principalmente en Sandwich y Folkstone (Inglaterra); en Massy (Francia), Latina (Italia), Karlsruhe (Alemania).

Estos cursos de especialización versaron especialmente sobre planificación de la investigación farmacéutica y farmacológica, formulaciones, experimentación animal y ensayo clínico de los medicamentos desarrollados.

Durante varios años, el Dr. David Martín Hernández fue vocal representante de industria en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid.

Estas y otras facetas relacionadas con el medicamento fueron galardonadas con uno de los premios del concurso científico de la Real Academia de Farmacia (1973) y con la Encomienda de la Orden Civil de Sanidad (1974).

Por su prestigio y por su conocimiento en los temas de investigación y de Industria Farmacéutica, en 1976 es nombrado Director Científico de Smith Kline and French S.A.E. y, posteriormente, en el año de 1964, al iniciar la mencionada empresa sus actividades en vacunas en España, se le nombró Director

de la División Biológica. Al fusionarse esa compañía con Beecham S.A., el Dr. David Martín Hernández ha continuado en esta prestigiosa posición en Smith kline Beecham (SB).

Desde 1981, David Martín Hernández es el representante español de la Sección de Industria y Tecnología de la F.I.P. (Federación Internacional Farmacéutica).

El Dr. David Martín Hernández es **Profesor Honorario** de la Cátedra de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid desde el año 1991 hasta la fecha.

Desde el año de 1995 es Miembro de honor de la Sociedad Española de **Medicina Preventiva**, Salud Pública e Higiene. Socio de Honor de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Desde 1989 es profesor de los cursos de Puericultura para Médicos, impartidos por la Sociedad Española de Puericultura, y desde 1997 es socio honorífico de esta Sociedad.

Como resultado de los trabajos de investigación realizados en la industria farmacéutica, independientemente de los trabajos publicados, mencionaremos que en la década de los setenta, el Dr. David Martín Hernández figura como único inventor de una patente suscrita por Pfizer S.A. para *Preparar y mantener separados los distintos componentes activos de una especialidad farmacéutica hasta su administración.*

En la década de los ochenta, intervino directa y activamente, en la investigación y el desarrollo del *ensayo clínico* de una vacuna antihepatitis B, obtenida por ingeniería genética, que constituye hasta la fecha, el mejor agente inmunogénico y de defensa contra la infección de los hepatocitos por el virus, cuyo riesgo de contagio es alto, con consecuencias de posible peligro especialmente para la integridad del hígado, con posibilidades de cronicidad y de amenaza de sufrir cáncer hepático primario.

También ha estado vinculado a la coordinación europea de la experimentación clínica del ácido selacrínico un producto diurético hipotensor.

Algunos de los trabajos del Dr. David Martín Hernández han sido publicados en prestigiosas revistas científicas internacionales : *Nature*, *Lancet*, *Experientia*, *Proceedings* de la Sociedad de Biología Experimental de Norteamérica y otras nacionales.

Su labor investigadora la podemos resumir citando diversos temas y orientaciones de sus trabajos y publicaciones :

- a) Algunas síntesis orgánicas que han dado lugar a patentes;

- b) Estudios de acciones de medicamentos sobre algunos sistemas enzimáticos;
- c) Interacciones de insulinas a nivel de membrana;
- d) Acciones farmacológicas de algunos agentes hipoglucemiantes orales;
- e) Investigaciones sobre biodisponibilidad de algunos medicamentos;
- f) Estudios de reacciones adversas e interacciones de medicamentos;
- g) Formularios y Guías de prescripción para la administración de medicamentos.

Pero el buen investigador no sólo es el que en su laboratorio descubre soluciones a problemas importantes y publica en una revista sus descubrimientos para la correspondiente difusión a nivel científico. También lo es el que procura difundirlos entre los profesionales, y especialmente el que tiene la inquietud de que la ciencia beneficie a la Humanidad, dando conferencias, cursos, charlas de divulgación al nivel más gráfico y comprensible. Este es el caso de nuestro nuevo académico.

El Dr. David Martín Hernández ha participado activamente en más de **treinta** congresos, Jornadas y Reuniones científicas nacionales e internacionales; en más de **veinte cursos** impartidos en Universidades, colegios de médicos etc.; ha pronunciado más de **cincuenta conferencias** en diferentes centros sanitarios como hospitales, sociedades científicas; ha publicado **cuarenta y tres trabajos científicos** en revistas españolas y extranjeras; tres manuales de especialización; ha participado como coautor en 7 libros, uno de ellos en lengua inglesa.

Es coautor de una patente de invención referente a procesos industriales.

El día 28 de junio de 1992, el Dr. David Martín Hernández fue nombrado Académico correspondiente de esta Real Academia de Farmacia, Instituto de España. Su discurso de ingreso se titulaba "*Investigación y Perspectivas de Nuevas Vacunas*" (2). La presentación corrió a cargo del Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, quien lo realizó, como es habitual en él, con gran brillantez y cordialidad a un compañero en el C.S.I.C. y amigo personal (5).

En aquel entonces, el tema que nos presentó tiene un valor introductorio y descriptivo sobre las vacunas actuales y las esperanzas que existían de encontrar vacunas nuevas y perfeccionadas aplicando los avances logrados con las tecnologías descubiertas hasta aquellas fechas. Pero ahora no es exagerado decir que en estos cinco años transcurridos, la biología molecular, los nuevos datos que poseemos sobre la respuesta inmunitaria y su modulación, de

las acciones de las numerosas citoquinas, el perfeccionamiento de las técnicas de ingeniería genética, y de plásmidos vectores de genes etc., ha impulsado a David, con ocasión de la toma de posesión de la **Medalla Número cuarenta y cuatro*** de la Real Academia de Farmacia, del Instituto de España, a estudiar mucho más y a profundizar en los principios, estrategias y métodos de perfeccionamiento y de investigación de las vacunas que vendrán a mejorar el estado de salud y la protección frente a las infecciones, y posiblemente a acabar con varias enfermedades y cronicidades de ellas, que siembran de sufrimiento el mundo actual, especialmente arriesga la vida de los niños. Es interesante su resumida exposición sobre las expectativas de lograr algunas vacunas no solo profilácticas, sino terapéuticas frente a males que preocupan tanto a la humanidad, como son el cáncer, el síndrome de la inmunodeficiencia humana y otras.

Como al Dr. Portolés, también a mí me unen muchos lazos de amistad y de afecto hacia el nuevo académico y reconozco mi responsabilidad en este acto. He hecho una reseña de David Martín como hombre de ciencia, pero en su trayectoria quisiera reflejar además unas facetas diferentes que se relacionan con su vida familiar: primero con su padre en Las Palmas de Gran Canaria, con su colegio en la playa de Las Canteras. En un hogar convivido y querido, con sus cuatro hermanos. Posteriormente, crea una nueva familia pero en Madrid. Según el Dr. Portolés (5), “se suele decir que detrás de un hombre famoso, existe una mujer laboriosa, inteligente y generosa que se sacrifica. Los franceses utilizan una expresión que a veces aplican con otro sentido, ”*cherchez la femme*”. En nuestro caso es Teresa Castilla Cortázar, también Dra. en Farmacia, que ha trabajado con él en el C.S.I.C. y publicado conjuntamente varios artículos científicos. Ella cooperó con él en su estancia en la Universidad en Cambridge, pero no solo con su labor investigadora, sino que también es el ángel tutelar de una familia de ocho hijos (desgraciadamente, el mayor de ellos, David murió de cáncer cuando tenía 37 años; era Dr. en Derecho y profesor titular de Legislación farmacéutica en la Universidad de Granada).

Este matrimonio de Teresa y David, es para mí, un prototipo de hogar feliz que se puede aplicar a una definición de matrimonio que leí y decía que: *el matrimonio es una promesa de envejecer juntos*. Deben de tener muchas anécdotas, pero creo que algunos de ustedes recordarán aquella ya hecha pública en esta Real Academia, del día de una jornada de trabajo de 12 horas en el laboratorio del C.S.I.C., y de volver a casa en una motocicleta bajo la lluvia, al poco tiempo de acostarse tuvieron que salir urgentemente para la clínica de maternidad, porque Teresa, embarazada y *fuera de cuentas*, daba a luz una niña (6).

* Vacante que fue anunciada en BOE núm.28 del Sábado 1 de febrero de 1997, y votación celebrada y ganada por mayoría de votos de los Excmos. Académicos de Número de esta prestigiosa Academia.

Independientemente de su entorno familiar, siempre se han sabido rodear de buenos amigos que han reconocido las cualidades que les acompañan siempre:

- a) Sus profundas convicciones religiosas.
- b) Sus tenacidades para conseguir los objetivos que se habían fijado en sus estudios.
- c) Sus fortalezas de espíritu frente a la adversidad.
- d) Sus grandes capacidades para ganarse el respeto y la amistad de sus compañeros.

Prueba de lo relatado es la anécdota que se ha narrado de él: “Durante su estancia en Barcelona, para completar su formación ingresó como ayudante del laboratorio de análisis del Departamento de la Cátedra de Medicina Interna del Prof. Dr. Soriano, en la Facultad de Medicina. Después de tres años de trabajar allá, un día tuvo la mala suerte de pipetear un hemocultivo para proceder a seriarlo e iniciar las pruebas de identificación de germen aislado. Se disponía de material defectuoso para realizar estas fases y le saltó una gotícula que, a pesar de proceder a su neutralización, se trataba de una bacteria muy virulenta que le causó una fiebre tifoidea experimental muy grave. Tuvo que ser internado durante un mes en el Hospital de infecciosos de Barcelona. Lejos de su familia (que vivía en Canarias), siempre contó con el apoyo de sus compañeros y amigos, que le ayudaron y acompañaron permanentemente en los momentos de mayor gravedad y además, con gran esfuerzo económico le conseguían el primer cloranfenicol que llegaba de contrabando al puerto de Barcelona, hasta que su familia se enteró y vinieron a ayudarlo, acompañarle y llevarle a casa. David, también entonces puso por su parte su profunda fe religiosa, y su entereza y fortaleza de espíritu (5).

En el año 1997, diversas sociedades científicas, sus compañeros y amigos le ofrecieron un merecido homenaje con motivo de su jubilación oficial, que se celebró en esta Real Academia de Farmacia, el 12 de febrero. Intervinieron D. Eduardo Rodríguez Rovira, D. Antonio Portolés Alonso y D. Lluís Salleras y Sanmartí. El homenajeado pronunció una conferencia sobre “*Investigación y Perspectivas de las Vacunas*” (6 y 7).

Tengo la impresión de que David Martín Hernández pasará a la Historia de la Farmacia Española como un prestigioso farmacéutico, un gran profesional e investigador, que desempeñó diversos cargos directivos en la industria farmacéutica, académico de esta Real Academia, especializado en inmunología aplicada a las vacunaciones, con una gran inquietud en promover la utilización de estos agentes de la medicina preventiva para evitar el sufrimiento inútil de

numerosas enfermedades infecciosas, encuadrándose y aumentando el número de profesionales españoles que, a través de los siglos XVIII, XIX y XX, han destacado en este campo de la inmunología aplicada.

* * *

En España, aunque con cierta oposición, se aprobó la Real Orden de 20 de noviembre de 1798 que dispuso que “*en todos los hospitales, casas de expósitos, casas de misericordia y en todas las instituciones que dependen de la Real munificencia, se ponga en práctica el método de inoculación antiviruela, a fin de que puedan disminuirse los desastres que causa esta calamidad*”.

Téngase en cuenta los estragos que ocasionaba la enfermedad de la viruela, cuando se calculó que en el siglo XVIII murieron 60 millones de personas por esta infección en todo el Mundo.

Sabemos mucho por la historia de las ciencias, que la vacunación tiene sus raíces en la antigua China (2). Durante los años 1692 a 1700, J Lister, que trabajaba entonces en China, escribió e informó a sus colegas ingleses. Sin embargo, la difusión de las vacunas como agentes preventivos se deben a las observaciones y estudios de Eduardo Jenner, hijo del vicario de Berkeley, pueblo del Condado de Gloucestershire (Inglaterra), donde nació el día 17 de mayo de 1749, y donde ejerció la medicina y murió.

Era una creencia popular que la infección sufrida por los granjeros, ordeñadores y lecheros por contagio de las vacas, proceso denominado *viruela bovina* (*cow-pox*), enfermedad siempre benigna en estos casos, era capaz de proporcionar una eficaz defensa contra la *viruela humana* (*small-pox*). Las vacas padecían una enfermedad pústulas en las mamas, la viruela bovina, que contagiaba a los ordeñadores, a quienes se les manifestaba una sintomatología dérmica similar. Unas pústulas recubiertas por costras, acompañada de fiebre ligera y malestar generalizado sin complicaciones.

Estos ordeñadores que habían sufrido el contagio de la viruela bovina, no padecían la enfermedad humana cuando se presentaba en forma de epidemia en sus localidades, pero sí que afectaba a sus familiares, y a otras personas que, aunque trabajaban con animales, no se dedicaban a ordeñar. Era evidente que los ordeñadores de las vacas, habían contraído una enfermedad *protectora* por contacto con dichos animales. Esta es la razón de que a estos agentes protectores se les llamara *vacunas*, por las cuales eran respetados por el virus de la viruela, es decir, quedaban inmunizados.

Antes de Jenner, otros científicos tales como Jobst Bose (1769), Benjamín Jesty (1774) y Jensen y Prett (1791), realizaron observaciones aisladas, y prácticas que abandonaron más tarde porque se les presentaron reacciones graves.

Jenner, por el contrario, realizó una experimentación sistemática, induciendo una ligera enfermedad, para proteger y evitar el sufrimiento de una enfermedad grave. Por ello pasó a la Historia, junto con Sara Nelmes, la ordeñadora infectada por las vacas, y de quien el 14 de mayo de 1796, Jenner cogió parte del contenido (linfa) de una pústula de una de las manos de esa señora con viruela bovina, y la inyectó, por vía intracutánea haciéndole dos pequeñas incisiones, en el brazo derecho del niño James Phipps. De esta forma, Jenner experimentó con él niño, comprobando que estaba inmunizado al inyectarle con posterioridad linfa de una pústula de un individuo que sufría esta enfermedad humana, y viendo que el niño ya no la podía padecer

En España, en el siglo XVIII fueron varios los que se ocuparon del problema de la viruela : En 1730, **José Sánchez de Caseda** trabajó en la inoculación de la vacuna en Alcarria-Jádraque; En 1757 **Andrés Piquer** publicó el “Dictamen del Tribunal del Real Protomedicato sobre inoculación de viruelas”; En 1765 **Antonio Capdevila** se ocupó de la inoculación en Tobarra, y escribió la “Disertación de la inoculación de las viruelas: En 1768, **Carlos Manuel Serrano**, médico de Majadelrayo, trabajó en la inoculación y escribió “El mejor específico de las viruelas.” También en 1778, se encuentra al **primer periódico español** que se ocupó de la inoculación de la vacuna fue “**El mercurio histórico y político**”, que en el número correspondiente al mes de febrero de 1768, página 139, aludía al método de Sutton.

También en 1768, **Francisco Rubio** escribió “Disertación sobre la inoculación de las viruelas”. En 1771 **Miguel Gorman y Baria** importó de Inglaterra el genuino método de vacunar. Gorman fue a Londres para aprender de Sutton el método de inocular viruela. Él inoculó en Madrid a dos hijos, un criado y a un negro del Conde O’Reilly, con el que colaboró como médico militar en la Expedición contra Argel, ordenada por Carlos III en 1775

En 1784 se publicó en Madrid la “Practica moderna de Inoculación”.

En España, durante el Siglo XIX fueron muchos los promotores de las vacunaciones: El Dr. **Francisco Piguillem y Verdacer**, médico al que algunos han considerado *el introductor y apóstol de la vacuna en España*, nació el año de 1771, y en noviembre de 1800, comenzó a vacunar a niños. En 1801 aparecieron en España los primeros libros sobre la vacunación Jenneriana, escritos por Piguillem. En 1821 fue nombrado miembro de la Comisión Central de Vacunaciones en París, así como miembro de la Real Academia de Medicina de Barcelona (1).

En 1800, la vacuna se distribuyó por toda España. Existe constancia de que lo fuera en Aranjuez, Barcelona, Galicia, Guadalajara, Madrid, Navarra, Segovia, Tarragona y País Vasco. En cada una de los lugares destacaron diversos profesionales que promovieron la vacunación.

El Rey Carlos IV, conoedor del problema sanitario, y por iniciativa de Don **José Antonio Caballero**, Ministro de Gracia y Justicia, organizó una expedición sufragada por la Corona, cuyo objetivo era propagar la práctica de la inoculación de la vacuna en las Posesiones españolas, incluido el Virreinato del Perú. La redacción y ejecución del Proyecto, fueron encargados al médico y cirujano militar Don **Francisco Javier de Balmis y Berenguer** (4). Era cirujano honorario de Cámara de Carlos IV. El Proyecto se tituló “**Derrotero que debe seguirse para la propagación de la vacuna en los dominios de Su Majestad en América**”.

En junio de 1803, la Junta de Cirujanos de Cámara constituida por Don **Antonio Gimbernat**, Don **Leonardo Galli** y Don **Ignacio Lacaba**, dio la aprobación al Proyecto, y se inició lo que se denominó *Expedición Filantrópica de la Vacuna Antivariólica*. Esta expedición, desde 1803 a 1810, recorrería más de 100.000 kilómetros, visitando diversas zonas de Europa, Asia, África, y América, Salvando de una muerte segura a muchísimas personas.

Partió de La Coruña el día 30 de noviembre de 1803, a bordo de la corbeta **Maria Pita**, a las órdenes de Don **Pedro del Barco**, teniente de Fragata de la Real Armada. El equipo médico estaba constituido por Don **Francisco Javier Balmis y Berenguer**, acompañado por Don José Salvany Lleopart, como subdirector cirujano; como médicos ayudantes figuraban Don Manuel Julián Grajales, Don Antonio Gutiérrez Robredo y Don Ramón Ochoa. Como practicantes les acompañaban Don Francisco Pastor Balmis y Don Rafael Lozano Pérez. Como enfermeros viajaban Don Pedro Ortega, Don Basilio Bolaños, Don Antonio Pastor y Don Ángel Crespo.

Con este equipo de profesionales sanitarios viajaban 22 niños de la Casa de Expósitos de La Coruña. Estos *niños vacuníferos* fueron los que llevarían “de brazo a brazo,” la vacuna pues, en aquellos tiempos, no se podía hacer por otro procedimiento ni con otros medios. Cada semana se vacunaba a dos de ellos con linfa procedente de las pústulas de los inoculados la semana anterior.

La expedición hizo una primera escala en Santa Cruz de Tenerife (del 08/12/1803, al 06/01/1804), a continuación se dirigió a Puerto Rico (09/02/1804 al 12/03/1804); después a Caracas (20/03/1804 al 08/04/1804). Desde el puerto venezolano de La Guaira, la expedición se dividió en dos secciones: la dirigida por Salvany, tomó rumbo a la América meridional, cuya labor duró hasta el 21 de julio de 1810. La otra sección de la expedición quedó bajo el mando de Balmis y se dirigió a La Habana y a la península de Yucatán, para seguir el itinerario que comprendió: las Islas Filipinas, Macao, Cantón, Santa Elena, y vuelta a España el día 7 de septiembre de 1806. En 1810, marchó al Nuevo Mundo, de donde regresó definitivamente el 15 de febrero de 1813, y en el año de 1819, moría Balmis.

Como complemento de la labor de Balmis y Salvany, en el Perú, las primeras vacunaciones preventivas fueron realizadas por **Pedro Belorno**, médico del apostadero de Callao (23 de octubre de 1905).

La labor que realizaron Balmis y sus compañeros fue trascendental, al propagar la vacuna por dichos territorios en una gesta llena de peligros y contratiempos en los años finales del siglo XVIII y comienzos del XIX, prestando un buen servicio a la Humanidad, demostrando que estaban dotados de un alma generosa y de un profundo sentimiento al bien de la Patria, difundiendo por todo el mundo el buen nombre de España.

Como dijo **Javier Mazana** (4): “Sería pródigo el referirnos a la cronología exacta de las distintas expediciones complementarias o secundarias que, por razones logísticas tuvieron lugar en aquel entonces, así como los detalles acerca del número de inoculados, los centros sanitarios y toda la infraestructura creada para dicho fin”. Habría que consultar estudios más o menos pormenorizados de los especialistas en el tema: **Ricardo Archila, Julio del Castillo y Domper, S.F.Cook, Gonzalo Díaz de Yraola, Francisco Fernández del Castillo, Juan Bautista Lastres y Anibal Ruiz Moreno**. Pero yo creo que los datos que hemos expuesto, reflejan con claridad la magnífica contribución española a la historia de la profilaxis antivariólica. Pienso que ni Jenner, ni Píguillem, ni Balmis ni otros promotores de la vacunación antivariólica, sospecharían nunca que se originaría alguna vez, vacunas para prevenir tantas enfermedades infecciosas, como existen en la actualidad, y las que la investigación promete ofrecer en el futuro.

Otros ejemplos de virus patógenos en animales, como el virus vaccinia, que no lo son para el hombre pero que poseen la propiedad de desarrollar inmunizaciones humanas, se encuentran en los virus de la influenza (aviar) y en los rotavirus (bovino y rhesus).

Posteriormente a los estudios de Jenner y aún en el siglo XIX, Pasteur, Chamberland y Roux iniciaron sus trabajos sobre la atenuación de patógenos conservando la acción inmunizante, logrando una vacuna contra el carbunco (1881). Años más tarde (1884), J. Ferrán, otro español preparó la vacuna atenuada contra el cólera. En 1885 Pasteur y Roux trabajaron con virus atenuados obteniendo la vacuna antirrábica. En 1896, siguiendo el método de inactivación de bacterias patógenas conservando la acción inmunizante, Kolle obtuvo la vacuna contra el cólera y Pfeiffer y Wright la vacuna contra la fiebre tifoidea.

En España, como en el resto del Mundo, en el siglo XX se continuó con las campañas de vacunación contra la viruela. Se realizó un esfuerzo internacional sin precedentes, coordinado por la Organización Mundial de la Salud (1), iniciando en 1967 el “Programa intensivo de erradicación de la viruela” con una vacuna activa y equipos sanitarios especializados. Diez años más tarde

(26/10/1997), se registró en Somalia meridional el último caso de viruela endémica en el Mundo: Ali Maou Moralín, de 23 años, cocinero del Hospital de la ciudad de Merka, que se había contagiado catorce días antes por dos enfermos ingresados en dicho centro sanitario (1). Sin embargo, el 11 de agosto de 1978, la doctora Janet Parker del laboratorio de virología de Birmingham enfermaba de la viruela y moría después de contagiar a su madre Helen-Witcomb (1).

A finales de 1979, la “Comisión Internacional para la erradicación mundial de la viruela” certificó su definitiva desaparición. El 8 de mayo de 1980, la XXX Asamblea de la Organización Mundial de la Salud declaró la viruela oficialmente erradicada como enfermedad en todo el Mundo. Con ello se culminó la labor de tantos profesionales y la promesa del Director General de la O.M.S., que en 1974 había prometido la desaparición en breve de la viruela (1).

Hemos querido reseñar y resaltar la labor de España en la Promoción de la vacuna antivariólica durante los siglos XVIII, XIX y XX; pero después de la vacuna antivariólica surgieron otras “vacunas” que, como procedimientos médicos han contribuido en este siglo a prevenir enfermedades propias de la infancia, entre las que se pueden citar la primeramente denominada “parálisis infantil” que posteriormente se extendió a los adultos con el nombre de poliomielitis (1). En Madrid, en los años 1957 y 1958 hubo una epidemia que nos afectó a varias personas mayores, algunas de las cuales murieron por haberles afectado a los pulmones. A mí me aparecieron los síntomas el 28 de diciembre de 1957, día de los Santos Inocentes, a mis 39 años de edad. Gracias al descubrimiento, en 1949, de Ender, Wellwe y Robins de que el virus de la poliomielitis se puede propagar en cultivos de células no humanas ni de monos, posteriormente se elaboró la vacuna antipoliomelítica inactivada de Salk con los tres serotipos más patogénicos del polivirus (1953). En las fechas de la citada epidemia todavía no se había empezado a utilizar para adultos esta vacuna.

Otras de las vacunas de las que disponemos a finales del siglo XX son la de la tuberculosis (B.C.G. 1927), la de la fiebre amarilla (1937), la de meningitis (de virus inactivados o muertos), difteria, sarampión, rubéola, parotiditis, tosferina, hepatitis A y B, antitetánica, antigripal, ...

Pero en el siglo XX, en España se pueden citar varios acontecimientos entre los que podemos citar la introducción por primera vez en nuestro país en el calendario vacunal de 1980 de la vacunación triple vírica, en lo que intervino David Martín.

Nuestro nuevo académico fue además el promotor de la puesta en marcha de la vacunación universal contra la hepatitis B de la población infantil en España y en el Norte de Italia (7). Colaboró con los doctores Salleras, Esteban y Bruguera en los estudios seroepidemiológicos en los grupos de riesgo y en la población general para demostrar la inmunogenicidad, eficacia y tolerancia de

la vacuna antihepatitis B obtenida por recombinación genética, demostrando que la infección por el virus de la hepatitis B se adquiere principalmente durante la adolescencia y edad adulta joven (7).

Actualmente, la industria farmacéutica, así como muchos centros de investigación institucionales en todo el Mundo, prosiguen con su labor intelectual, científica silenciosa, persistente en este maravilloso mundo de la **Inmunología**.

* * *

REFERENCIAS CORRESPONDIENTES AL DISCURSO DEL EXCMO. SR. D. LEÓN VILLANÚA FUNGAIRIÑO

- (1) FERRÁN A. MORAGAS LLOP. (1996).
Dos-cents anys de vaccins (1796-1996). Els orígens: De Berkeley a Puigcerdá (Ed. Ateneu Barcelonès).
- (2) MARTÍN HERNÁNDEZ, DAVID. (1992) Investigación y perspectivas de Nuevas Vacunas. Real Academia de Farmacia, Instituto de España. Discurso de ingreso como Académico correspondiente.
- (3) MARTÍN HERNÁNDEZ, DAVID. (1997).
Información personal.
- (4) MAZANA C., JAVIER. (1996).
Francisco Xavier de Balmis y Berenguer (1753-1919). El Jenner español. Un capítulo en la Historia de la profilaxis antivariolosa.
- (5) PORTOLÉS ALONSO, ANTONIO. (1992).
Presentación del Dr. David Martín Hernández, en su toma de posesión como Académico correspondiente. Real Academia de Farmacia. Madrid, 28 de mayo de 1992.
- (6) PORTOLÉS ALONSO, ANTONIO. (1997).
Homenaje al Dr. David Martín Hernández con motivo de su jubilación oficial. Real Academia de Farmacia. Madrid, 12 de febrero de 1997.
- (7) SALLERAS SANMARTÍ, LLUIS. (1997).
Homenaje al Dr. David Martín Hernández con motivo de su jubilación oficial (12 de febrero de 1997).

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

Ab2a 111.
Ab2b 111.
Ab2E 111.
Ab2g 111.
Abortogénico 125.
Acciones inmunitarias 111.
Acciones inmunomoduladoras 126.
Acidez 43.
Ácido desoxirribonucleico 29.
Ácido N-acetil neurámico 33.
Ácido ribonucleico 29, 120.
Ácido siálico 102.
Ácidos nucleicos 120.
Activación 34, 43, 44, 52, 66.
Activar las células presentadoras del antígeno 47, 48, 53, 66, 68 128.
Actividad citolítica 47.
Adenina 113.
Adenovirus 35.
Adhesinas microbianas 33.
Adyuvante 24, 30, 63, 82, 108, 117.
Adyuvantes 63, 105, 123.
Adyuvantes en vacunas 123.
Agente infeccioso 23, 41.
Agentes extraños 39.
Agentes inmunizantes 13.
Agregados complejos del antígeno 66.
Agregados multimoleculares 131.
Agresión antigénica 57.
Aguas 40.
Aislamiento y manipulación del gen 113.
Alergias 31.
Alimentos contaminados 40.
Ambiente 39, 41.
Anemias 31.
Anfipáticas 127, 133.
Antibióticos 16, 62, 115, 62.

Anticuerpos 28, 46, 49, 53.
Anticuerpos antiidiotípicos 107, 111 (107, 111).
Anticuerpos complementarios 110.
Anticuerpos naturales 42.
Anticuerpos neutralizantes 28.
Antigénicas (respuestas) 103, 107.
Antígeno 16, 24, 29, 51, 57, 58, 59.
Antígeno K 30.
Antígeno T-dependientes 59.
Antígeno T-independientes 59.
Antígeno/inmunógenos 59.
Antígeno-combinante 109.
Antígeno-moléculas del MHC 51, 53, 54.
Antígenos 16, 29, 53.
Antígenos capsulares 30.
Antígenos de cápsida 28.
Antígenos de superficie 118.
Antígenos deseados 112.
Antígenos extraños 53.
Antígenos poliméricos 64.
Antígenos sintéticos 64.
Anti-idiotipos 64, 110.
Aspergillus fumigatis 37.
Atenuación de los gérmenes 15, 24, 114.
Atharva Veda 20.
Atracción linfocitos T.CD4+ 128.
Ausencia de respuesta 49.
Autorregulación 110, 111.

B

Bacilo del ántrax 23, 36.
Bacilos 29.
Bacillus anthracis 36.
Bacterias 23, 27, 28, 112.
Bacterias gram-negativas 30.
Bacteriófagos 28.

Barreras 32.
Barreras de defensa 41.
Barreras naturales 32.
Bases celulares 61.
Behring 73.
Benjamin Jesty 21.
Berkeley 20.
 β -defensinas-2 43.
Biodegradable 131.
Biología molecular 63.
Blastomyces dermatitidis 75.
Bloqueo periférico 49.
Boca 40, 41.
Bordetella pertussis 36, 74, 75.
Borrelia burgdoferi 36, 75.
Brugia malayi 76.

C

Cadena compleja 68.
Cadena ligera 55, 103.
Cadena pesada 55.
Cambios antigénicos 70.
Cambios conformacionales 106.
Cambios en el tropismo 70.
Campylobacter jejuni 36.
Cancer 135, 136.
Cancerogénico 125.
Candida albicans 37.
Capacidad anamnésica 57.
Cápsulas 29.
Cascada de complementos 45.
Cascada de idiotipos 111.
Célula efectora APCs 48, 65, 127, 128, 129.
C. profesional presentadora de antígeno.
Células citotóxicas 49.
Células de Kupffer 46.
Células de Langerhans 127, 43.
Células de memoria 57, 66.
Células dendríticas 43, 127, 129, 130.
Células fecales.
Células infectadas 48, 70.
Células neoplásicas 16, 47, 135.
Células NK 42, 48.
Células presentadoras de antígenos 48.
Células profesionales efectoras 127.
Células tumorales 48.
Centrocito 57.
Cepas vivas atenuadas 61, 76.
Cestodos 31.

Ciclación del péptido 107.
Ciclos Vitales 31.
Ciencia biológica 23.
Cifras de la viruela 22.
Cilios 42, 44.
Cinéticas de las respuestas inmunitarias 137.
Circulación intracelular 126.
Citomegalovirus 35, 76.
Citoplasma 29, 46, 129.
Citoquinas 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 65, 66, 68, 71, 117, 126, 131, 135, 137.
Citoquinas apropiadas 117.
Citoquina IL-8 44.
Citoquina TNF- α 44.
Citosina 113.
Citosol 29.
Citosol celular 120.
Clamidia 62, 103.
Clamidias 103.
Clonación de genes 120.
Clonación molecular 24, 73.
Clono 51, 66.
Clostridium botulinicum 36.
Clostridium tetani 77.
Coccidioides immitis 76.
Cocos 28.
Coeficientes inmunogénicos.
coexpresión de IL-12 117.
Coglicólido de poliactida 131.
Coleagenasa 46.
Cólera 23, 24, 103, 115.
Cólera aviar 23.
Colonias granulocito-macrófago 136.
Complejo MHC de la Clase I 63.
Complejo MHC de la Clase II 63.
Complejos de Histocompatibilidad 51.
Complejos moleculares de antígeno-anticuerpo 45, 66.
Complejos moleculares de histocompatibilidad 51.
Complementos 45, 46, 48, 49.
Complementos proteicos 46.
Comportamiento de las citoquinas 126.
Conformación de la molécula 106.
Conformación estructural 53, 55, 102.
Conformación estructural única 55.
Conjugación con proteínas 63.
Conjugación química 99.
Conjugaciones eficaces 100.
Conocimientos específicos 34.
Contagio 19, 32, 40.

Contagio de la madre 40.
Coronavirus 35.
Corta vida media 125.
Corynebacterium diphtheriae 36, 76.
Costo de producción 15, 104, 106.
Cromosoma 29.
Cronicidades 16.
Cryptococcus neoformans 76.
Cubierta celular 128.
Cultivar gérmenes 23.
Cytomegalovirus 76.
Chlamydia sp 77.

D

Datos de eficacia del agente inmunogénico 22.
Datos de seguridad del agente inmunogénico 65.
Defensa inespecífica 44.
Dengue 35.
Dermatofitos comunes 37.
Desarrollo de péptidos 104.
Desarrollo tecnológico 64.
Descontrolados 17.
Destoxificación genética 103.
Determinaciones de las dosis 73.
Determinante antigénico 58, 59, 66.
Dextrano 33, 64.
Diferentes alelos de MHC 53.
Dificultan el desarrollo de vacunas 70.
Difteria 15, 36.
Diplococos 29.
Disenterias 36.
DNA/cDNA se integra 70.
DNA-recombinante 24, 41, 63, 67, 72, 74, 112, 113, 120.
Dosis infectante 33.
Dualismo 110.

E

Edad 42.
Efectos alostéricos 59.
Efectos autoinmunes 102, 105, 112, 125.
Efectos inespecíficos 125.
Eficaces 11, 16, 22, 24.
Ejemplo de atenuación 114.
Elastasa 46.
Empíricamente 61.

Encefalitis 35.
Encefalitis equina 96.
Ender 73.
Endocitosis 127, 128, 129.
Endolisosoma 127, 128.
Endosoma 127.
Endotelio 44.
Endotoxinas 30, 45, 127.
Endotoxinas perjudiciales 118.
Enfermedad infecciosa 22, 52, 68.
Enfermedades autoinmunes 105.
Enfermedades infecciosas 68.
Enfermedades sexuales 40.
Enlaces covalentes 59, 68.
Enlaces interatómicos 98.
Enlaces peptídicos 106.
Ensayos clínicos 65, 73.
Entamoeba histolytica 76.
Enterotoxina termolábil 103.
Enzima 33, 46.
Enzimas 33, 43, 44, 46, 120.
Eosinófilos 121, 127.
Epigrama de Pasteur 23.
Epitopo 58, 98, 110, 112.
Epitopo interesante 69, 99, 109, 110.
Epitopos 16, 30, 31, 52, 66, 67, 68, 101, 102, 104, 105, 108, 111, 112, 116, 117, 126.
Epitopos peptídicos 104.
Epstein-Barr 35.
Era bacteriana 23.
Era jenneriana 20.
Erradicación 21, 22, 61, 69.
Erradicación de la viruela 21.
Erradicación global 22.
Escape endosómico 129.
Escarificación 20, 21.
Escherichia coli 33, 36, 103, 119.
Escherichia coli cepa K1 101.
Escherichia coli enterotoxigénica 78.
Especies comensales 31.
Especificidad 57.
Especificidad selectiva 50, 65, 123, 124, 131.
Espirilos 29.
Espiroquetas 29.
Esporas 23.
Esquema de inmunización 73.
Estabilidad 126.
Estado de portador 69.
Estado nutricional 42, 135.
Estafilococos 29.
Estamoeba coli 31.

Estereoquímica 98.
Estrategias de investigación 24.
Estreptococos 29, 30.
Estructura más sencilla 107.
Estructura molecular 125.
Estructuras inmunógenas 66.
Estructuras moleculares 24, 50, 125.
Estructuras moleculares inmunógenas 24.
Estructuras poliméricas 59, 105.
Estructuras simplificadas 105.
Estructuras terciarias 98.
Estructuras tisulares específicas 40.
Estudios de inmunogenicidad 73.
Estudios de seguridad 73.
Etiopatogénesis 64, 67.
Exclusión 114.
Excreciones normales 42.
Exógena 45.
Exopeptidasa 129.
Exotoxina 23, 45.
Experimentación animal 47.
Exposición del epítipo 126.
Expresión de los antígenos 65.
Expresión de los genes 112, 113.

F

Factor de crecimiento 46.
Factor de necrosis tumoral 45, 48.
Factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos 46, 136.
Factores de Tausing y Tada 51.
Factores enespecíficos 70.
Factores estimuladores de colonias de monocitos 46.
Factores genéticos 42.
Factores hormonales 42.
Factores inespecíficos 42.
Factores solubles 45.
Fagocitosis 42.
Fagocitosis por opsonización 49.
Fagocitosis 42, 46, 49, 71, 132.
Fagosoma 46.
Fase de latencia 34.
Fase efectora 44.
Fase I 73.
Fase II 73.
Fase III 73.
Favorecen el desarrollo de vacunas 68.
Fibroblastos 46.

Fibronectina 42, 46.
Fiebre amarilla 35.
Fijación del complemento 117, 126.
Fimbria 29.
Flagelina 116.
Flagelos 29.
Flora bacteriana intestinal 44.
Formas confrontables 98.
Formas moleculares dinámicas 98.
Forssman 30.
Fosfatasa 46.
Fosfato de polirribosilo 99.
Fosfato de ribinol 30.
Fosfatos de ésteres 99.
Fosfolipasa 125.
Fosfolípidos 58.
Fracción C3 32.
Fracción Th1/Th2 32.
Francisco Javier de Balmis 22.
Fuerzas conformacionales 106.
Fusión membranal endosómica 129.

G

Galactosamina-6-fosfato 30.
G-CSF 46, 127.
Gen S del VHB 118.
Genes polimórficos 51.
Genoma 34, 70, 105, 114, 116.
Genoma DNA 34, 37.
Genoma RNA 15, 37, 114.
Genomas viral 34.
Germen patógeno 32.
Giardia lamblia 37.
Glándulas sebáceas 43.
Glándulas sudoríparas 43.
Glicolípidos 98.
Glicoproteínas 98.
Glicosiltransferasa 98.
GM-CSF 46.
Gonococos 29.
gp 27, 118.
gp 120, 34.
gp 41, 34.
Gram-negativas 30.
Gram-positiva 30.
Granulocitos 50.
Granulomas 125.
Grupos α -2,9 siálico 101.
Guanina 113.

Guante cerrado 129.
Guarda Memoria 50.

H

H. influenzae tipo b 36.
Haemophilus Ducrey 78.
Haemophilus influenzae no-tipable 79.
Haemophilus influenzae tipo b 79, 99.
Haemophilus influenzae b 79, 99.
Hansenula polymorpha 118, 119.
Hapteno 30, 58.
Haptenos 60, 72.
HBsAg 116, 118.
Helicobacter pilori 76.
Helminthos 31.
Helpers Th 50.
Helpers Th1 50.
Helpers Th2 50.
Hemolisina 115.
Hepatitis A 35.
Hepatitis B 35.
Hepatitis D 81.
Hepatitis E 81.
Herpes simplex tipo 1, 35, 81.
Herpes simplex tipo 2, 35, 81.
Herpes virus 6 (humano) 35.
Heteroantígenos 31.
Hiper celularidad 125.
Hipersensibilidad 31.
Histoplasma 37.
Histoplasma capsulatum 82.
Homogeneidad 65.
Hongos 31, 40.
Hueco estructural 68.

I

ICAMS 47.
Identificación de los dominios 113.
Identificación del agente causal 73.
IgA 32.
IgA en las mucosas 32.
IgE 47, 121.
IgG 32, 47, 57.
IgG en la sangre 32.
IgG 69, 121.
IgG2a 121.

IgG2b 47, 121.
IgG3 47.
IgG1 121.
IgM 57.
IL-1, 45, 46, 125.
IL-10, 50, 64, 126.
IL-13, 50.
IL-2, 135.
IL-3, 50.
IL-4, 50.
IL-5, 50.
IL-6, 45, 50, 64.
IL-7, 46.
IL-8, 44.
Imitar su estructura 92, 111, 112.
Inclusión 46, 114.
Inconvenientes de v. de síntesis peptídica 106.
Incorporación del péptido 107, 129.
Inducción deseada 129.
Inducción selectiva 65.
Infección moderada 69.
Infección por el VIH 70, 120.
Inflamación 43, 44, 45, 46.
Influenza 35.
Influenza virus 35, 87.
Ingeniería genética 24, 67, 72, 73, 112, 113, 119.
Inmunidad 33, 39.
Inmunidad adquirida 28, 44.
Inmunidad celular 31.
Inmunidad específica 50.
Inmunidad humoral 49.
Inmunidad inducida 47.
Inmunidad innata 39, 43, 44.
Inmunidad natural 44.
Inmunidad protectora 50, 62.
Inmunodeficiencia humana 35.
Inmunogenicidad 59, 65, 104.
Inmunogenicidad empobrecida 72.
Inmunogenicidades débiles 72.
Inmunogénicos 62, 72, 98, 99, 104, 107.
Inmunógeno 58, 61, 72, 99, 108.
Inmunógenos 52, 58, 60, 127.
Inmunoglobulinas 33, 43, 50, 56, 64, 72, 112.
Inmunología básica 24, 63.
inmunología celular 28.
Inmunomodulación 23, 42, 47, 109, 126.
Inmunoterapia del cáncer 135.
Inoculación directa del DNA (RNA) 120.
Inoculación intranasal 20.
Integridad corporal 40.

Integridad de la estructura del epítipo 127.
Integridad morfológica 42.
Interacciones de ligando-receptor 68.
Interacciones hidrofóbicas 99.
Interacciones idiotípicas 109.
Interacciones linfocitarias 68.
Interacciones moleculares 68.
Intercambiar secuencias 114.
Intercomunicadores celulares 39.
Interferones 45, 48.
Interferón- γ 47.
Interleuquina-4, 136.
Investigación básica 64, 67, 68, 73.
Investigación inmunológica 16, 43.
Isotipo de anticuerpo 122.

J

Jaime Ferrán 14.
James Phipps 21.
Jenner 20, 21, 73.
Jugos gástricos 44.

K

Klepsiella pneumoniae 99.

L

La era de Pasteur 23.
Lactiferrina 43.
Lacto-N-neotetraosa 102.
Lactoperoxidasa 43.
Lady Mary Montagu 21.
Latencia 34.
Lectina 130.
Legionella pneumophila 36, 88.
Leishmania 88.
Lepra 103.
Leucocitos 44.
Leucocitos NK 71.
Liberación controlada del antígeno 131.
Ligando 53, 65, 68, 129.
Linfocito Th0 136.
Linfocitos B 55, 100.
Linfocitos B activados 43, 100.
Linfocitos citotóxicos 130.
Linfocitos intraepiteliales 43.

Linfocitos T 32, 43, 51.
Linfocitos T antígeno-específico 52.
Linfocitos T citotóxicos 50, 65, 128, 130, 136.
Linfocitos Tc 50.
Linfocitos T-CD-8 citotóxicos 50.
Linfocitos T-CD8+, 50, 130, 136.
Linfocitos T-dependientes 59, 99.
Linfocitos Th1 50, 136.
Linfocitos Th1-CD4+, 50.
Linfocitos Th2, 50, 59, 136.
Linfocitos T-independientes 59.
Linfocito-T dependencia 59.
Linfoquinas 57.
Lípidos 29.
Lipo-aminoácido tripalmitoil-S-glicerilcisteinil
seril-serina 108.
Lipofílicas 133.
Líposomas 132.
Lisosoma 46.
Lisozima 46.
Listeria monocytogenes 36.
Louis Pasteur 23.

M

Macrófago 32, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 65, 70,
108, 121, 125, 127, 134, 136.
Macromoléculas 59, 60.
Malaria 37, 62, 120.
Malformaciones 40.
Manipulación biológica 72.
Manipulación del DNA 107, 113.
Manos 40.
Marcador simple 69.
Marca la cepa 115.
M-CSF 46.
Mecanismos celulares 104.
Mecanismos de defensa 29.
Mediadores químicos 47.
Mediadores solubles 44.
Medicina preventiva 15.
Médula 23, 47.
Médula ósea 47.
Mejora de la inmunogenicidad 63, 116.
Mejora de las vacunas disponibles 62, 63.
Membrana 29.
Membrana celular 34.
Membranas mucosas 43.
Memoria 109.

Memoria inmunitaria 50, 57.
Memorizar 39.
Memótopo natural 109.
Meningococos 29, 101.
Mensajeros 132.
Mesosoma 29.
Metalopeptidasas 103.
Metástasis tumoral 16.
Métodos bioquímicos 63.
MHC de clase I 54.
MHC de la clase II 56.
MHC-I 48, 54.
MHC-II 56.
Microesferas 134.
Microesferas poliméricas 134.
Microfilaria 37.
Microflora normal 42, 71.
Microorganismos inmunógenos 61.
Microorganismos oportunistas 33.
Microorganismos enteros 61.
Microesferas 131.
Mieloides inmaduros 47.
Mimetismo molecular 105.
Miocitos 121.
Miofibrillas 121.
Mitogénica 108.
MM-CSF 136.
Modelo de animal 67, 70.
Modelos animales 34, 67.
Molécula polipéptidica 55, 106.
Moléculas adyacentes 106.
Moléculas anfipáticas 133.
Moléculas CD28, 65.
Moléculas co-estimuladoras 65.
Moléculas del MHC 51, 53.
Moléculas del MHC de la clase I, 54.
Moléculas MHC de la clase II, 56.
Monocito 48.
Monoglicosilada 118.
Moraxella Catarrhalis 88.
Morbilidades 14, 15, 22, 73, 100.
Mortalidades 14, 15.
Mosaicos antigénicos 30.
Mucosas 43.
Mucus 43.
Multiestimulantes 105.
Mutación antigénica 70.
Mutagénesis dirigida 103.
Mutante de escape 70.
Mutantes inducidos 103.
Mycobacterium leprae 36, 89.

Mycobacterium tuberculosis 36, 89.
Mycoplasma pneumoniae 90.

N

Nanoesferas 131.
Natural killer 46.
Necesitan adyuvante 123.
Necrosis local 125.
Neisseria gonorrhoeae 36, 90, 99.
Neisseria meningitidis 36, 90, 99.
Neoglicoconjugación 64.
Neoglicoconjugados 64, 99.
Neumonía 31, 37.
Neumococos 28, 30.
Neumolisina 99, 100.
Neurotoxinas del tétanos 103.
Neutralizar los efectos patógenos 49.
Neutrofilos 44.
Neutrofilos polinucleares 44.
Ningún reservorio 69.
Niños pequeños 100.
Niños vacuníferos 22.
Nivel de polimorfismo 57.
Nódulo linfoide 127.
Nódulos linfáticos 51.
No-glicosada 118.
No-infecciosas 105.
Nucleasas 46.
Nuevas estrategias 32.
Nuevos adyuvantes 72.
Nutrición 42.
NYVAC 117.

O

Oligopéptidos sintéticos 107.
Oligosacárido conjugados a las proteínas 99.
Opsonización 121.
Organello citoplasmático 46.
Órgano de Golgi 129.
Óxido nítrico 46.

P

Pam3CSS 108.
Pandemia de cólera 114.

Papilomavirus 35.
 Papillomavirus humano 35, 86.
 Paradigma Th1/Th2 32.
 Paraglobósidos 102.
 Parásitos 27, 31.
 Paratropos 110.
 Pared celular 29.
 Parotiditis 35.
 Partículas multiméricas 59, 126.
 Parvovirus 35.
 Pasteur 23.
 Patogénesis 32, 103.
 Patógenos 70, 125, 133, 135, 136.
 Patógenos comunes 62.
 Patógenos exóticos 16.
 Pelo 29.
 Penetración celular 68.
 Péptidoglicano 30.
 Período de latencia 70.
 Permeabilidad vascular 44.
 Piel 43.
 Pinocitosis 127, 129.
 Pirogenéticas 45.
 Pistola de genes 120.
 Planificación racional 34.
 Plaquetas 46.
 Plásmido 119.
 Plásmido vector 119.
 Plásmidos 116.
 Plásmidos portadores 116.
 Plasmodio 103.
Plasmodium 91.
Plasmodium sp 91.
Pneumocystis carinii 37.
 Poblaciones desnutridas 108.
 Pobremente inmunigénicas 107.
 Poder neutralizante 106.
 Poli-láctido-co-glicólidos 134.
 Polimerización de péptidos 108.
 Polímeros sintéticos 131, 134.
 Polimorfismo genético 51, 54.
 Polioma virus BK 35.
 Polioma virus JC 35.
 Poliomeilitis 35.
 Poliovirus 35, 91.
 Polipéptidos sintéticos 107.
 Polisacárido C 30.
 Polisacáridos 22, 33.
 Polisacáridos capsulares 33, 45, 99.
 Polivalente 72.
 Porciones peptídicas 127.
 Portadores antigénicos 72.
 Posible riesgo 62.
 Precusores 47.
 Preparaciones químicas 113.
 Presentación del MHC-clase I, 34.
 Presentar el antígeno 121, 127.
 Prevención 134.
 Principios empíricos 73.
 PRIT12.363, 119.
 Procariontes 29.
 Procedimientos de biosíntesis 103.
 Procesado del antígeno 47.
 Procesamiento proteolítico 126.
 Proceso citosólico 129.
 Proceso de presentación 127.
 Proceso etiopatogénico 27.
 Productos de necrosis 45.
 Productos inmunológicos 23.
 Promotor TDH3 119.
 Propiedades antigénicas sanguíneas 102.
 Prostaglandinas 45.
 Proteasas 47.
 Protección para toda la vida 17.
 Proteicas 29.
 Proteína A 30.
 Proteína C reactiva 45.
 Proteína CRN197, 103.
 Proteína del MHC 47.
 Proteína extraña 53.
 Proteína HBcAg 115.
 Proteína nativa 104.
 Proteína tóxica 103.
 Proteína-M 118.
 Proteínas de fase aguda 48.
 Proteínas de membrana externa 63.
 Proteínas extracelulares 53.
 Proteínas fibrosas 30.
 Proteínas no estructurales 28.
 Proteosoma 129.
 Proyecto de investigación 32.
 PRP 79.
Pseudomonas aeruginosa 36.
Pseudomonas aeruginosa 92.
Pseudomonas cepacia 92.
 Puertas de entrada 32.

Q

Queratinocitos 121.
 Quimiotaxis 45.

R

Rabia 23, 35.
Reacción autoinmune 98.
Reacción indeseada 98.
Reacciones de autoinmunidad cruzada 99.
Reacciones granulomatosas 130.
Receptor CD4 33.
Receptor de membrana 50.
Receptor del linfocito T 56.
Receptor IL-1, 46.
Receptores α y β 43.
Receptores del sistema inmunitario 49.
Receptores Fc de inmunoglobulinas 33.
Receptores para el IFN- γ 47.
Reconocer e identificar a los epítomos 66.
Reconocimiento antígeno-linfocito B 128.
Región Transmembranal 54.
Regiones hipervariables 109.
Regulación de la respuesta inmunitaria 47, 51.
Resistentes 62.
Respiratorio sincitial 35.
Respuesta inmunitaria innata 16, 32, 125.
Respuesta 44, 125.
Respuesta Ab1 110.
Respuesta Ab3 111.
Respuesta anti-id 111.
Respuesta de fase aguda 45.
Respuesta deseada 59.
Respuesta exagerada de anticuerpos 98.
Respuesta inflamatoria 44, 46.
Respuesta inmunitaria 16, 49.
Respuesta inmunitaria no-específica 42.
Respuesta protectora 11, 30, 70.
Respuestas inmunitarias 59.
Respuestas selectivas 65.
Respuestas Th1 y Th2 126.
Resultado biológico 68.
Retención celular 125.
Reticulo endoplasmico 128.
Retrovirus 34.
Reversiones virulentas 62.
Ribosomas 29.
Rickettsia 36.
Rickettsia rickettsii 92.
Riesgo de morir 19.
Rinovirus 35.
RNA, 29.
Robert Koch 23.
Rotavirus 35, 93.

Roux 23.
Rubéola 35, 93.

S

Salmonella typhimurinum 115.
Sabin 73, 117.
Saccharomyces cerevisiae 119.
Sales de aluminio 125.
Salk 73.
Salmonella 36.
Salmonella atenuada 115.
Salmonella typhi 94.
Salmonella-flagelina-negativa 116.
Sarah Nelmes 21.
Sarampión 35, 88.
Schistosoma mansoni 94.
Secreción de citoquinas 66.
Secreciones internas 42.
Secuencia del DNA 113.
Seguridad 22, 61.
Selección entre los Th1 y Th2, 126.
Selectividad 50.
Semilla principal 120.
Semillas de trabajo 120.
Señales estimuladoras 39.
Señales inhibitorias 39.
Señales moduladoras 39.
Serogrupos A y C de los meningococos 101.
Serotipos importantes 69.
Shigella (dysenteriae, shigae, flexneri) 36.
Shigella dysenteriae 94.
Shigella flexneri/sonnei 94.
Shigella spp 94.
Sialilhomopolímeros 98, 102.
Sida (VIH) 35.
Signos inhibitorios 34.
Signos intracelulares 132.
Simplificación 105.
Síntesis de proteínas 29.
Síntesis peptídica 102.
Síntoma 31, 32, 33.
Sistema inmunitario 11, 39, 40.
Sistemas de expresión 113.
Sistemas novedosos de liberación de antígenos 64.
Sitio de unión al péptido 55.
Situaciones inmunitarias 42.
SKRIT4376 120.
Sobrevivían 19.

Sobrevivir 23.
Solapante 59.
Soluciones acuosas 60.
Staphylococcus epidermidis 33.
Staphylococcus aureus 36.
Streptococcus grupo A 78.
Streptococcus grupo B 78, 99.
Streptococcus pneumoniae 36, 95, 99.
Streptococcus pyogenes 36.
Sustancia 20.
Subunidad A de la toxina del cólera 103.
Subunidad S1 103.
Subunidades antigénicas 72.
Subunidades recombinantes 133.
Superficie celular 42.
Superficie extracelular 54.
Supervivencia 135.
Supresión de linfocitos 110.

T

Tasas altas de mutaciones 70.
Tasas de morbilidad 14.
Toxoplasma gondii 37.
Tecnología del DNA-recombinante 24, 112.
Tecnologías de clonación 22.
Tecnologías nuevas 22.
Teratogénico 125.
Termoestabilidad química 106.
Tétanos 14.
Tétanos neonatal 40.
Th helper 34.
Th2, 50, 59.
Timina 113.
TNF- α 50.
TNF-betalinfotoxina 50.
Tolerancia inmunológica 100.
Toxoide 100.
Toxoide antidiftérico 99.
Toxoide antitetánico 99.
Toxoides 61.
Toxoides del cólera 100.
Toxoplasma gondii 96.
Trampa de linfocitos 125.
Transcripción 47.
Transferir material genético 113.
Transformar agentes patógenos en inmunizantes 113.
Transmisión 40.
Transmisión de citoquinas 68.

Transportadores peptídicos 46.
Trastorno de autoinmunidad 105.
Trastornos patológicos 112.
Treponema pallidum 30, 36, 96.
Treponema pertenue 36.
Trichomonas vaginalis 37, 97.
Tripanosoma africanum 97.
Tripanosoma cruzi 97.
Tripanosoma gambiense 97.
Tropismo 34.
Tuberculosis 103.
Tuberculosis pulmonar 103.

U

Unión de varios péptidos 105.
Unión no-covalente 52, 53.
Uniones covalentes 99.

V

V. anti-fiebre amarilla 24, 35.
V. antigripal 24.
V. antihemófillus influenzae b 36, 79.
V. antihepatitis B 80.
V. antimeningocócica 24.
V. antiparotiditis 35.
V. antipolio Sabin 24.
V. antipoliomielítica Salk 24.
V. antirrubéola 24.
V. antisarampión 24, 35, 88.
V. antiváricela 24, 35.
V. recomb.-Hep-B 80.
Vaccinia, virus 35.
Vacuna antitifoidea 24.
Vacuna anti-tosferina 24.
Vacuna BCG antituberculosis 36, 89.
Vacuna contra el cólera 36.
Vacuna de la hepatitis B 80.
Vacuna frente a la hepatitis A 35.
Vacuna ideal 17.
Vacunas anti-idiotipos 108.
Vacunas con componente novedosos de liberación de antígenos 24.
Vacunas de ácidos nucleicos 64.
Vacunas de antígenos sintéticos y anti-idiotipos 108.
Vacunas de Cepas Genéticamente modificadas 24.

- Vacunas de componentes purificados 24.
 Vacunas de DNA (RNA) 112.
 Vacunas de lipooligosacáridos 102.
 Vacunas de Neoglicoconjugados 99.
 Vacunas de polisacáridos 92.
 Vacunas de síntesis peptídica 107.
 Vacunas DNA recombinantes 112.
 Vacunas genéticamente inestables 117.
 Vacunas mejoradas 121.
 Vacunas preventivas nuevas 68.
 Vacunas recombinantes 112.
 Vacunas sintéticas 102.
 Vacunas terapéuticas 11, 16, 68, 134.
 Vanguardia de las defensas 47.
 Variabilidad genética 34.
 Varicela-zoster 35.
 Variolización 20.
 Vectores 121.
 Vehículos adecuados 24.
 Veneno de serpiente 20.
 Ventajas de las v. de ácidos nucleicos 122.
 Ventajas de las v. de síntesis peptídica 105.
 Vía citoplasmática 121.
 Vías de transmisión 40.
 Vías respiratorias 40.
Vibrio cholerae 36.
 Vibriones 29.
 Vigilancia antitumoral 52.
 VIH 33.
 Viruela 13, 15, 22.
 Virulencia 32.
 Virus 27.
 Virus de Epstein-Barr 78.
 Virus de la Encefalitis japonesa B 87.
 Virus de la fiebre amarilla 34, 95.
 Virus de la gripe 24.
 Virus de la inmunodeficiencia humana 82, 86.
 Virus de la rabia 92.
 Virus de la rubéola 93.
 Virus del Dengue 77.
 Virus del herpes simplex 82.
 Virus escape 34.
 Virus fijado 23.
 Virus hepatitis A 80.
 Virus hepatitis B 80.
 Virus hepatitis C 81.
 Virus parainfluenza 90.
 Virus salvaje de la rabia 92.
 Virus syncytial 92.
 Virus vaccinia 21.
 Virus varicela zoster 96.
 Virus variola 21.
 VIS 43.
- W**
-
- Wassermann 30.
- Y**
-
- Yersin 23.
Yersina pestis 36.
 Yetminster 21.
- Z**
-
- Zona citoplasmática 54.