

Inmunización frente a infecciones

Librado Ortiz-Ortiz

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México y Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa, Guanare, Portuguesa, Venezuela.

Recibido Mayo 15, 2009. Aceptado Junio 10, 2009

INMUNIZATION AGAINST INFECTION

Resumen

En este reporte se revisan varios aspectos de inmunización y vacunación. Se reseña la historia del origen de la vacunación, así como las formas teóricas de la misma. Además, se hace una descripción de la clasificación de las vacunas y varios temas relacionados con la manera de aumentar su inmunogenicidad por medio de adyuvantes diferentes, entre ellos los utilizados para estimular las mucosas. Finalmente, se hace un relato breve de las diversas vacunas bacterianas y virales que actualmente se utilizan.

PALABRAS CLAVE: Inmunización, vacunación, vacunas, adyuvantes, vacunas bacterianas, vacunas virales

Abstract

In this report various aspects of immunization and vaccination are reviewed. The history of the origin of vaccination as well as the theoretical features of the latter are narrated. In addition, a description is made of vaccines classification and the different facets related to increasing its immunogenicity by means of dissimilar adjuvants, among them those used to stimulate the mucosa. Finally, a brief delineation is made of various bacterial and virus vaccines used at the present time.

KEY WORDS: *Immunization, vaccination, vaccines, adjuvants, bacterial vaccines, viral vaccines*

Introducción

La inmunización es el proceso por medio del cual el sistema inmune (SI) de un individuo se fortalece contra un determinado agente, conocido como inmunógeno, y constituye el mecanismo de defensa más efectivo contra las infecciones microbianas. Cuando el SI de un individuo se expone a moléculas que son extrañas al mismo, desarrolla una respuesta inmune (RI), y también la capacidad de responder rápidamente a un encuentro subsecuente a través de lo que se conoce como memoria inmunológica. Los elementos más importantes del SI que son mejorados por la inmunización son las células T y las B, y los anticuerpos que producen. Las células T y B de memoria son las responsables de una respuesta rápida a un segundo encuentro con la molécula extraña.

La inmunización se puede llevar a efecto por medio de varios procedimientos, comúnmente

conocidos como vacunación. Las vacunas contra microorganismos que causan enfermedad, pueden preparar el SI del organismo, ayudando a combatir o prevenir una infección. La inmunización puede ser llevada a cabo de forma activa o pasiva. Las vacunas constituyen un tipo de inmunización activa. La inmunización activa puede ocurrir de modo natural cuando un individuo se expone a un agente infeccioso, de forma que cuando el sujeto no se ha encontrado previamente con ese agente, se inmuniza. Así, el SI formará anticuerpos y otras defensas contra el microorganismo. La próxima vez que se encuentre con el mismo, la RI puede ser muy eficiente; este sería el caso de alguien que durante la infancia contrae una infección que solo la adquiere una vez, ya que después de la primoinfección se encuentra inmune. La inmunización pasiva se realiza cuando los elementos del SI preformados son transferidos a una persona, de manera que el organismo no necesita producir estos elementos por sí mismo.

Los anticuerpos conocidos como antisueros pueden ser usados para la inmunización pasiva, la cual actúa de manera rápida, aunque es de vida corta ya que los anticuerpos son degradados, y como no hay células B que los produzcan, ellos desaparecen. La inmunización pasiva puede ocurrir de manera fisiológica, cuando los anticuerpos son transferidos de la madre al feto durante el embarazo, para protegerlo antes y después de su nacimiento. La inmunización pasiva artificial se administra normalmente por inyección y se usa cuando ha ocurrido un brote de una enfermedad particular, o en caso de una emergencia para tratar una toxicidad, como en el caso del tétanos. Los anticuerpos a ser transferidos pueden ser producidos en animales, aunque hay un riesgo de choque anafiláctico debido a la RI contra las proteínas extrañas del suero animal. En consecuencia, en la actualidad se están tratando de utilizar anticuerpos humanizados que se producen in vitro por medio de cultivos de células (1).

Vacunación

Historia

Las primeras civilizaciones, como las de Egipto, India y China, hacían referencia de las enfermedades infecciosas, aunque el diagnóstico de las mismas se puede cuestionar. La descripción de la viruela aparece en China en siglo IV A.C. (2). Desde el siglo X A.C. ya se administraba a los individuos susceptibles el fluido de las pústulas o las costras secas de las lesiones cicatrizantes, para volverlos inmunes. En los sitios inoculados se observaban lesiones desagradables, y síntomas generales; sin embargo, esta variolización resultaba en una enfermedad menos severa y una reducción significativa de la mortalidad. La esposa del embajador inglés en Constantinopla, Lady Mary Montagu promocionó la variolización en Gran Bretaña, al observar como su hija que había sido vacunada en la localidad en 1718, se protegía de la infección. Posteriormente, alrededor de 1760, los médicos ingleses observaron que las ordeñadoras rara vez padecían la enfermedad, aunque algunas presentaban lesiones en las manos causada por la infección contraída en la ubre de la

vaca. La enfermedad vacuna mostraba ciertas similitudes con la humana. No obstante, fue Edward Jenner que no solo fue el primero en publicar sino también en probar la inmunidad, desafiándola con viruela. La ordeñadora Sara Nelmes donó un poco del fluido presente en sus manos infectadas con la viruela vacuna, y Jenner el 14 de Mayo de 1796, inoculó a James Phipps con este material. Su reporte fue rechazado para su publicación en The Royal Society, aunque lo publicó en forma privada. Estos estudios iniciaron la era de la vacunación y ya en el siglo XIX se exigía en Europa. Curiosamente, Jenner no tenía idea de cómo actuaba la vacuna. Fueron Louis Pasteur y Roberto Koch quienes un siglo después contribuyeron al entendimiento de este proceso. Pasteur a través de destruir la teoría de la generación espontánea de las bacterias, y Koch, con sus famosos postulados, que si se cumplían, establecían a un agente como causante de la enfermedad, contribuyeron a la determinación del agente etiológico causante de una enfermedad infecciosa. Pasteur encontró que las bacterias que se cultivaban por largos períodos en medios artificiales perdían virulencia. Así, inactivo a la *Pasteurella séptica*, causante del cólera de las gallinas, y demostró que su inoculación en pollos los protegía cuando eran desafiados con cultivos frescos virulentos. En 1881 vacunó borregos con ántrax atenuado, y al proceso le dio el nombre de vacunación en honor a Jenner. Aún cuando desconocía que la rabia era causada por un virus y no una bacteria, lo inactivo en cordones espinales de conejo, culminando con la inmunización de Joseph Meister, quien había sido mordido por un perro rabioso. Sus hallazgos le permitieron con donativos de reyes y adinerados, construir el Instituto Pasteur en 1888 (3).

Se han usado también vacunas atenuadas, entre ellas destaca el bacilo de Calmette y Guérin (BCG), quienes aislaron el bacilo de una vaca y lo atenuaron después de 213 subcultivos en un período de 13 años. El BCG mostró ser efectivo en infantes en la prevención de la tuberculosis miliar y meníngea, aunque su capacidad para prevenir la tuberculosis pulmonar en adultos, que mata a mucha gente, es motivo de gran controversia (4).

Otro gran hallazgo fue el encontrar que algunas

enfermedades, como la difteria y el tétanos, son causadas por la secreción de poderosas exotoxinas. Von Behring y Kitasato descubrieron los anticuerpos en 1890, y tuvieron algún éxito usando la inmunización pasiva frente a la difteria, utilizando antitoxina diftérica preparada en caballos. Los autores obtuvieron el primer Premio Nobel de Medicina. La antitoxina se mezclaba con preparaciones de toxina cruda de los sobrenadantes de cultivos, y en esta forma de complejos se inocularon para la inmunización activa en la prevención de la difteria y el tétanos (3). Poco después se encontró que las toxinas podían ser inactivadas con formaldehído, dando lugar a los toxoides, que tienen actividad protectora, y su utilización después de 1930 disminuyó el impacto de estas infecciones (5). No obstante, es necesario mencionar que hubo muchos fracasos en el uso de agentes infecciosos como medios de vacunación.

La revolución en la preparación de vacunas virales fue causada por el cultivo de virus en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, lo cual permitió el desarrollo de dos de ellas en los 30's del siglo pasado, la de fiebre amarilla atenuada y muy efectiva, y la del virus de la influenza muerto con menor éxito. Las vacunas virales se hicieron más accesibles con el advenimiento de técnicas de cultivos de tejidos, lo que facilitó el desarrollo de la vacuna de Salk frente a la poliomielitis, un enemigo mortal (6). La vacuna inactivada de Salk, introducida en 1955, favoreció entre 1955 y 1961, la administración de 300 millones de dosis de la vacuna, disminuyendo la enfermedad 10 veces. Hubo un suceso que fue desastroso, el incidente Cutter como se le conoció, en donde dos lotes de vacuna no fueron apropiadamente inactivados con formalina, dando lugar a 149 casos de polio, lo cual causó gran pánico y disminuyó el interés en la vacunación, especialmente porque la preparación de la poliomielitis atenuada de Sabin, fue introducida en 1961 (7). Ya para 1965 había reemplazado a la de Salk en USA. No obstante, debido a que hubo una rara reversión de la neurovirulencia, particularmente del virus de la poliomielitis de tipo 3 (un caso de parálisis flácida aguda en 2.7 millones de vacuna oral de la poliomielitis administrada), inclino a las autoridades

estadounidenses a recomendar en un principio una dosis inyectable de Salk para minimizar este riesgo. En el mismo sentido, inicialmente la vacuna del sarampión con virus atenuado se llevaba a cabo administrando al mismo tiempo anticuerpos anti-sarampión. Sin embargo, el uso de una cepa viral más atenuada resolvió el problema, aportando más información para el desarrollo de nuevas vacunas. Así, surgieron la de las paperas en 1967 y un año después la de la rubéola con virus atenuado. Posteriormente surgió la vacuna triple de sarampión, paperas y rubeola, que se logró en 1969 y se empezó a aplicar después de 1971. Ulteriormente, se usó la vacuna tetravalente de sarampión-paperas-rubeola-varicela (8).

Uno de los sucesos más relevantes del siglo pasado fue la eliminación de la viruela a nivel mundial, a través de la vacunación, iniciada a nivel mundial en 1959, hasta el reporte del último caso de viruela en 1977. La certificación de tal evento fue proclamada en Mayo de 1980 por la OMS (9). Es necesario mencionar que pasaron más de 4000 años desde su primera aparición, y 181 años después del uso de la primera vacuna, para que se lograra eliminar esta pandemia.

El objeto de una vacuna es estimular la RI sin someter a una persona al riesgo de padecer la infección por el microorganismo inmunizante. Una vacuna ideal es aquella que confiere el mismo grado de inmunidad que la infección natural, en particular para aquellas enfermedades donde la inmunidad es sólida, o aún mejor que la observada en forma natural en aquellas enfermedades en donde no se produce una inmunidad fuerte. Para lograr estos objetivos la mayoría de las veces es necesario dar dosis de refuerzo, para así despertar la memoria inmunológica, específicamente, la capacidad de responder con mayor intensidad a un antígeno cuando se expone nuevamente al mismo. Las vacunas pueden dar lugar a todo tipo de RI, como formación de anticuerpos, células T de ayuda (Th) CD4⁺ de tipo 1 o 2, y T CD8⁺, aunque las vacunas desarrolladas han recaído en la capacidad de producir anticuerpos; no obstante esto puede ser modificado regulando la RI (10). El efecto primario de las vacunas ha sido diseñado para prevenir la infección, aunque una de las

primeras vacunas, la de la rabia, se administró después de que la infección se había iniciado, por lo que actualmente se investigan también vacunas terapéuticas que sirvan para reforzar la RI inadecuada, particularmente en enfermedades crónicas o recurrentes.

Actualmente se cuenta con un número importante de vacunas de gran utilidad para la protección frente a enfermedades infecciosas. Sin embargo, es necesario un mejor entendimiento de la patogénesis microbiana y de las bases de la inmunidad protectora. La capacidad de inducir inmunidad humoral y mediada por células específicas para un determinado antígeno, es esencial para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas efectivas.

Bases teóricas

En general, los microorganismos poseen una gran variedad de antígenos que inducen una RI; sin embargo, regularmente solamente unas cuantas moléculas son relevantes en protección, por lo que actualmente se investiga sobre la identificación, purificación, y en lo posible clonación molecular de estos antígenos. En muchas infecciones microbianas los linfocitos T juegan un papel central en la generación de una RI protectora. Después de la inmunización, las células dendríticas atrapan a los antígenos microbianos y viajan a los ganglios linfáticos regionales donde le presentan los antígenos procesados a las células T inocentes. Estas células T son estimuladas a proliferar y diferenciarse a células T efectoras y de memoria. Las células T activadas, efectoras y de memoria, proporcionan ayuda a las células B en los ganglios linfáticos y viajan a los sitios de infección donde secretan citocinas antimicrobianas y destruyen células infectadas. En el humano se han descrito dos tipos de células de memoria, basados en sus propiedades funcionales y migratorias. La célula T central-memoria (T_{CM}) se encuentra predominantemente en los órganos linfoides y no puede ser activada de manera inmediata, mientras que la célula T efectora-memoria (T_{EM}) se encuentra principalmente en el tejido periférico y sitios de inflamación y exhibe una rápida función efectora. La mayoría de las

vacunas actualmente en uso inducen respuestas de anticuerpo, capaces de mediar protección por largo tiempo contra virus líticos como influenza y viruela. Opuestamente, vacunas contra patógenos crónicos que requieren respuestas inmunes mediadas por células para controlar la infección, como *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la hepatitis C (VHC), no se encuentran disponibles en la actualidad o no son eficaces. El conocer los mecanismos por medio de los cuales se pueda inducir una RI celular poderosa después de la vacunación, debe facilitar el desarrollo de vacunas protectoras e inocuas contra las enfermedades emergentes (11). La memoria inmunológica es un aspecto esencial de las RIs adquiridas después de infecciones naturales o de vacunación. Aunque se conoce la dinámica de las células T y B, así como su papel en la respuesta de memoria de anticuerpos en la defensa contra infecciones, sin embargo, poco se sabe acerca de la calidad de las células T de memoria requeridas para el resguardo contra un microorganismo infeccioso. Las evidencias obtenidas en modelos experimentales de infecciones virales sugieren que las células T_{CD8^+} T_{CM} pueden constituir la correlación con protección frente a la enfermedad (12). En un modelo murino de infección por *Leishmania major* se ha observado que linfocitos T_{CM} $CD4^+$ median una inmunidad de larga duración contra el parásito (13).

Vacunas

Clasificación

Las vacunas se han preparado con: gérmenes viables atenuados, microorganismos muertos, antitoxinas, subunidades, incluyendo péptidos, vectores, ácidos nucleicos, y comestibles, que sirven de base para su taxonomía.

Vacunas con microorganismos vivos atenuados

Las vacunas actualmente en uso con organismos atenuados presentan más del 90% de eficacia, con una protección por varios años, debido a que el organismo se multiplica y crea un estímulo

antigénico similar al que produce la infección. Esto también tiene una desventaja, el que en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes el microorganismo puede multiplicarse y adquirir grandes proporciones, como se ha observado en la vacunación con la viruela y el BCG. En algunas vacunas atenuadas se puede dar el caso de mutaciones que puedan restaurar la virulencia, como sucedió con la de la poliomielitis. Con el advenimiento de la biología molecular es posible, a través de la ingeniería genética, obtener vacunas cuya reversión a la virulencia sea imposible (14).

Vacunas con microorganismos muertos

Este tipo de preparaciones requieren de refuerzos ya que el organismo no se multiplica. Entre ellas destacan la vacuna de Salk de la poliomielitis inyectable y la de la hepatitis A. Otras son parcialmente efectivas como la de la influenza y la tífica, y algunas son de pobre eficacia y corta duración como la del cólera (15).

Antitoxinas

Las antitoxinas han probado su efectividad, aunque en el caso de las enterotoxinas no lo han sido tanto. Sin embargo, un derivado de la enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxigénica, que produce la llamada diarrea de los viajeros, sensible al calor, genéticamente privado de sus propiedades tóxicas, ha mostrado eficacia y podría constituir una vacuna de gran utilidad (16). No obstante, los toxoides tetánicos y diftéricos contienen muchas impurezas; además el formaldehído usado en la privación de su poder tóxico causa un entrecruzamiento de péptidos del medio de cultivo, presentes en la preparación final. Empero, el hecho de que han mostrado eficacia ha limitado la presión de cambiarlas.

Vacunas con subunidades

La vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo B (vacuna Hib o PRP) originalmente se preparó con el polisacárido de la cápsula, donde la RI dependía de la edad del receptor, dejando desprotegido a

niños menores de 18 meses de edad (17). Esto dio lugar a investigaciones y la preparación de una vacuna conjugada, la cual contenía el polisacárido de la cápsula de superficie de la bacteria unido a una proteína. Hay seis tipos diferentes de esta bacteria (a-f). Los organismos del tipo b son responsables del 95% de todas las cepas que causan enfermedad invasora y la Hib protege contra este tipo. Actualmente se cuenta con otras vacunas conjugadas como la tetanospasmina, la proteína mutante de la difteria, y la proteína de la membrana externa del meningococo del grupo B (18). La vacuna constituida por la proteína de superficie del virus de la hepatitis B (VHB) es muy inmunogénica a dosis bajas y no requiere de adyuvantes, como otras vacunas que requieren adyuvantes más poderosos que las sales de aluminio, actualmente en uso para adsorber las proteínas puras dentro de partículas pequeñas (19).

En los últimos años, el conocimiento de la secuencia y estructura de proteínas de organismos patógenos ha dado lugar a grandes expectativas, particularmente sobre la posibilidad de usar esta información en el desarrollo no solamente de mejores vacunas sino también en el fomento de las inexistentes. Las vacunas con péptidos, son generalmente sintetizadas y se encuentran en experimentación, como la del VIH y la malaria. No obstante, el diseño de vacunas con péptidos requiere el conocimiento de la naturaleza y extensión de la RI; en consecuencia, el progreso en la obtención de este tipo de inmunógenos no ha sido exitoso, reflejando limitaciones en este sentido (20).

Vacunas recombinantes

Una nueva línea de investigación se ha abierto con la elaboración de vacunas que usan genes de antígenos importantes que son introducidos en virus acarreadores, como el de la vaccinia (viruela bovina), sin alterar su replicación, y que pueden ser expresadas en las células del hospedador, donde el virus se divide (21). Es decir, un microorganismo inofensivo actúa como vector de genes de antígenos de patógenos. El tamaño del genoma del virus de la vaccinia permite poder introducir varios genes de antígenos, pudiendo cubrir vacunas

contra varias enfermedades, o citocinas que favorezcan la RI. Desafortunadamente no se conoce ninguna vacuna de este tipo en el mercado, debido a la reticencia que se tiene acerca de la vaccinia que pueda causar alguna patología en individuos inmunodeficientes (22). Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que ratones carentes de timo que son infectados con una vacuna recombinante de vaccinia que expresa además la interleucina (IL) 2 murina, resuelven la infección viral rápidamente, mientras que ratones infectados con el virus control desarrollan una enfermedad por vaccinia progresiva (23). Lo anterior indica que la incorporación del gen de la IL-2 en vacunas virales vivas, pueden prevenir las complicaciones severas que se manifiestan en receptores con un SI dañado. Por medio de este procedimiento se ha elaborado, también a nivel experimental, una vacuna contra el gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, la cual induce una respuesta humoral y celular que protege ratones contra el desafío con el virus de la influenza (24).

Por medio del virus de vaccinia, cepa Ankara atenuada (MVA), que carece de virulencia en animales normales o inmunocomprometidos, y que mostró ser inocuo en 120,000 humanos inoculados (25), se inmunizaron macacos con el virus MVA que tenía los genes para env/gag/pol del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), lo que disminuyó la severidad de la enfermedad causada por el desafío con el SIV. Asimismo, el virus MVA que expresaba el antígeno tumoral modelo *lacZ* (MVA-βgal), inoculado en macacos y posteriormente desafiados por vía intravenosa con un número letal de células tumorales fueron protegidos, previniendo el establecimiento de metástasis tumoral y prolongando la vida de los animales con tumores establecidos (25). No hay duda que en el futuro éste tipo de vacunas resulten de utilidad para el humano.

Vacunas con ácidos nucleicos

Las vacunas con ADN o ARN consisten del ácido nucleico genéticamente diseñado para producir una RI. Están constituidas por piezas circulares pequeñas de ADN bacteriano, denominados

plásmidos, que han sido diseñados genéticamente para producir una o dos proteínas específicas de un microorganismo. El ADN es inyectado dentro de las células del cuerpo, donde la maquinaria interna de las células del hospedador leen el ADN y lo convierten en proteínas del patógeno, que dan lugar a una RI (26). La primera demostración de una RI inducida por un plásmido se reportó cuando se inocularon ratones con uno que expresaba la hormona del crecimiento humano y que indujo anticuerpos en lugar de alterar el crecimiento (27). Por medio de esta metodología se han inmunizado animales de laboratorio con el ADN de la influenza aviaria, el cual es inyectado en la capa epidérmica de la piel, donde entra a las células de la red inmunológica, creando inmunidad y facilitando tanto el tratamiento como la prevención de la enfermedad. La diferencia principal con el método del vector viable es que el ADN, que codifica al antígeno de interés, no puede replicar en el cuerpo humano. El plásmido involucrado se crece usualmente en *E. coli*, y su origen de replicación no es adecuado para células humanas. Para favorecer su expresión en células de mamífero es necesario un promotor fuerte (citomegalovirus humano) y tener un ARNm con la secuencia de terminación y poliadenilación adecuado. Después de la inyección intramuscular, el ADN entra al citoplasma y después al núcleo del miocito, aunque no se integra en el genoma. El blanco del arma genómica son las células dendríticas y las musculares, que no presentan una división alta, ni una homología extensa con el plásmido, por lo que la recombinación homóloga no es probable. No se puede descartar una integración al azar, aunque hasta la fecha no se han reportado efectos adversos. Las partículas de oro inyectadas con la pistola génica son depositadas en la epidermis, de donde encuentran su ingreso a las células de Langerhans que posteriormente buscaran los ganglios linfáticos. Los mioblastos actúan como una fuente de antígeno que de alguna manera lo transfieren a las células presentadoras de antígeno (CPAs), de una forma que les permite ser procesados por la vía del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. La eficacia de las vacunas de ADN en generar linfocitos T citotóxicos (CTLs) es una de sus características

más relevantes. En teoría, la persistencia de la síntesis de antígeno obvia la necesidad de inyecciones de refuerzo. Además, se logra con pequeñas cantidades (nanogramos) de ADN un excelente compromiso de los CTLs. Este tipo de vacunas ha mostrado gran eficacia en monos Rhesus, cuando se vacunaron con ADN de la cubierta y gag-pol-nef del VIH-1, induciendo una buena respuesta de CTLs, y anticuerpos que protegen a monos en contra del desafío con el virus patógeno (29). Con el objeto de mejorar estos inmunógenos de ADN, se han incluido moléculas coestimuladoras y citocinas que puedan aumentar y modular la RI. Así, la coadministración de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), citocinas proinflamatorias (IL-1 α , tumor de necrosis tumoral [TNF]- α , y TNF- β), interleucinas (ILs) Th1 (IL-2, IL-12, IL-15, e IL-18), ILs Th2 (IL-4, IL-5, e IL-10), y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) con vacunas construidas con ADN, conllevan a la modulación de la magnitud y dirección (humoral o celular) de las RIs (30). Este tipo de vacunas no ha tenido la aplicación esperada, debido a los problemas involucrados en las agencias que regulan su inocuidad, ya que existen posibilidades de carcinogénesis, autoinmunidad al ADN, y a largo plazo a tolerancia inducida por la liberación constante de pequeñas cantidades de antígeno por un período prolongado.

Vacunas comestibles

Actualmente se investiga en el uso de plantas transgénicas para preparar vacunas comestibles. Las plantas transgénicas obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética, representan una alternativa eficaz y económica para la producción de estas preparaciones. Se ha demostrado que tienen una gran capacidad para producir anticuerpos, que son utilizados en el diagnóstico y tratamiento de varias enfermedades. Las plantas de tabaco, papa, soya, alfalfa, y arroz han sido transformadas para producir grandes cantidades de estas proteínas. Asimismo, las plantas transgénicas pueden cultivar vacunas comestibles. Además, ofrecen ventajas como no usar jeringas para inyecciones, más económicas y fáciles de

administrar.

La mayoría de las vacunas de uso clínico emplean microorganismos inactivados o atenuados. Los atenuados son incapaces de replicarse en individuos normales, aunque en personas inmunosuprimidas pueden causar enfermedad. Esto puede prevenirse usando proteínas individuales que sean capaces de generar una respuesta equivalente a la originada por el germen completo. La metodología requiere de la clonación del gen o de los genes de interés a partir del germen patógeno, su introducción en otro organismo o transformación, donde pueda expresarse para su posterior purificación y administración en humanos, por vía parenteral (31). La generación de plantas transgénicas productoras de la proteína recombinante, evitaría la purificación e inyección de la proteína recombinante. La ingesta oral de la planta transgénica permite la absorción intestinal y la posterior estimulación del SI del individuo (32). Se ha reportado por esta tecnología la inducción de una RI protectora frente a diferentes agentes patógenos (33).

Esta forma de vacunación por medio de plantas comestibles es una metodología prometedora, particularmente en países en vías de desarrollo, los cuales carecen de la infraestructura necesaria para la administración de vacunas convencionales. Además, se aumenta la posibilidad de adquirir inmunidad en mucosas contra los agentes infecciosos que invaden al cuerpo a través de una superficie mucosa. Un problema importante con este tipo de vacunas es la degradación de los antígenos en el estómago e intestino, antes de que puedan inducir una RI. Para evitarlo se han desarrollado varios métodos, entre los cuales se encuentra el uso de cepas recombinantes de microorganismos atenuados como *Salmonella*, de vehículos de bioencapsulación, como liposomas, y finalmente plantas transgénicas. La bioencapsulación de la subunidad B de la toxina lábil de *E. coli* en maíz transgénico indujo una fuerte respuesta inmune en ratones. Asimismo, se han expresado en plantas de papa transgénicas la subunidad B de la toxina del cólera (34); en la del tabaco, la proteína de superficie de la cubierta del virus de la hepatitis B

(35-37); en la de tomate una glicoproteína del virus de la rabia (38); en la del tabaco, la proteína de la cápside del virus de Norwalk (39, 40). No obstante, antes de ser utilizadas, es necesario que los derivados de plantas cumplan con los estándares de seguridad y funcionamiento que se exigen en otros sistemas de producción.

Adyuvantes y principios de inmunidad de las mucosas

Los adyuvantes son sustancias y formulaciones que tienen la capacidad de aumentar la RI a un antígeno. El adyuvante completo de Freund promueve la formación de anticuerpos y la hipersensibilidad de tipo tardío al antígeno con el cual es mezclado (41), aunque el adyuvante incompleto de Freund, que no tiene micobacteria, promueve solamente la formación de anticuerpos (42).

Las sales de aluminio son el único adyuvante permitido en humanos (43), como el fosfato de aluminio en forma amorfa (43, 44) y el hidróxido generalmente en forma cristalina (45). Se han propuesto cuatro mecanismos por medio de los cuales estas sales promueven una mejor RI, específicamente: (a) formación de un depósito en el sitio de inyección que permite que el antígeno sea liberado gradualmente, extendiendo así el tiempo posible para que el antígeno interactúe con las CPAs y los linfocitos; (b) las partículas de las sales de aluminio son más fácilmente fagocitadas por macrófagos, neutrófilos, y células dendríticas, favoreciendo la captación y eficiencia de la presentación del antígeno; (c) por estimulación directa del SI a través de un aumento en la producción de citocinas Th2 que favorecen la respuesta humoral, y (d) desestabilización de la estructura proteica cuando se adsorbe a ciertas sales de aluminio, lo que las hace más susceptibles al procesamiento proteolítico por el SI, dando como resultado un aumento en la presentación del antígeno (46).

Algunos factores que promueven la inmunogenicidad de los antígenos son la formación de partículas, polímeros, emulsiones, microencapsulación, o la adición de productos bacterianos como adyuvantes químicos, citocinas,

o agentes que los guían hacia las CPAs.

Precipitación de antígenos solubles

La precipitación de los antígenos con aluminio, como sucede en las vacunas de difteria, tétanos, hepatitis B y otras vacunas, promueve una mejor RI. Con el uso de $Al(OH)_3$ o $AlPO_4$, el antígeno es incorporado en un precipitado de tipo gel insoluble, por interacciones electrostáticas. Las partículas formadas son de un diámetro de 0.1 a 1 μm de diámetro. Los antígenos precipitados en aluminio causan una buena formación de anticuerpos, incluyendo IgE, aunque poca hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) o citotoxicidad mediada por células T.

Otras entidades en partículas que han sido usadas como adyuvantes son los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), liposomas, y virosomas.

ISCOM

Los ISCOMs consisten de partículas submicrosomales que se forman cuando los virus son tratados con saponina. Estas consisten de colesterol, saponina, fosfolípido, y proteínas de la cubierta viral. La matriz del ISCOM es el glucósido Quil A, extraído de la *Quillaja saponaria* Molina, que forma micelas a una concentración crítica de 0.03%. En esta forma, probablemente tiene regiones accesibles para interacciones hidrofóbicas con las proteínas de membrana, de manera tal que produce complejos con ellas. Los ISCOMs preparados con las proteínas de membrana de los virus de parainfluenza 3 (PI-3), virus de sarampión, o rabia, muestra una mayor inmunogenicidad que las proteínas de membranas solas (47).

Liposomas

Los liposomas consisten de esferas sintéticas formadas de capas lipídicas que pueden encapsular antígeno y actuar como agente inmunizante y adyuvante; su potencia depende del número de capas lipídicas (48), carga eléctrica (49), composición (50), y método de preparación (51,

52). Los liposomas tienen algunas de las características de los ISCOMs. Los liposomas contienen dimiristoilfosfatidil colina, dimiristoil fosfatidil glicerol, colesterol y monofosforil lípido A. Los liposomas tienen la ventaja de ser vehículos biodegradables que mimetizan las estructuras de las membranas de la bicapa lipídica natural. Los liposomas son ávidamente ingeridos por los fagocitos, y permiten la liberación lenta de los antígenos (53). Estos adyuvantes parecen favorecer la presentación de antígenos a las CPAs, incluyendo las células dendríticas, células foliculares dendríticas y linfocitos B. La captación del antígeno por las CPAs puede favorecer la inmunidad mediada por células (CMI) (54, 55).

Virosomas

Los virosomas son agregados multiméricos de proteínas transmembranales derivadas de virus, como la hemaglutinina del virus de la influenza, y los proteosomas, multímeros similares de proteínas transmembranales de bacterias. Los virosomas son acarreadores versátiles de antígenos, los cuales pueden ser incorporados por adsorción a su superficie, o integrados en la membrana lipídica. Estas proteínas permiten a las membranas del virosoma, fusionarse con células del SI y en esta forma presentar los antígenos específicos a las células blanco, favoreciendo una RI de primera clase, específica, aún con antígenos poco inmunogénicos. Una vez que los virosomas entregan al antígeno, son completamente degradados dentro de las células (56). Se ha preparado una vacuna frente al virus de Newcastle que infecta aves de corral, usando un virosoma del mismo, lográndose una seroconversión similar a la de la vacuna con virus viable, y además protección en contra del desafío con virus letal (57). Existen dos vacunas registradas en el mercado, que utilizan virosomas como adyuvantes y acarreadores de hepatitis A e influenza, que han sido aprobadas en decenas de países en donde se han inmunizado millones de pacientes. Una ventaja importante es que las vacunas que usan virosomas son adecuadas para infantes y personas inmunodeprimidas (58).

Polimerización de antígenos

Los antígenos pueden ser asociados a polioxipropileno y polioxietileno. También se usan polímeros de manosa, como las mananas, o de glucosa β 1-3, como las glucanas. Los péptidos se conjugan a mananas a través de espaciadores de aminocaproico, que producen una buena respuesta de anticuerpos (59). Los polímeros de acrílico se han usado en cirugía y pueden ser útiles como adyuvantes, ya que el procedimiento de polimerización es reproducible si se usa el mismo método (60).

Emulsiones

Estos adyuvantes incluyen los de aceite en agua o agua en aceite, como el adyuvante incompleto de Freund, adyuvante 65, Lipovant y Montanide, que propician la liberación lenta de antígeno (61). El mecanismo de acción de las emulsiones como adyuvantes incluye la formación de un depósito en el sitio de la inoculación, capacitando la liberación lenta del antígeno y la estimulación de las células plasmáticas formadoras de anticuerpo (42). Debido a los buenos resultados obtenidos a nivel experimental con el adyuvante de Freund, se ha tratado de obtener emulsiones similares que puedan ser de aplicación en el humano. Las emulsiones de agua en aceite consisten de pequeñísimas gotas de agua estabilizadas por medio de un agente surfactante, en una fase continua de aceite mineral u otro aceite, como el escualeno, donde se incorpora el inmunoestimulante soluble en el agua. Es frecuente encontrar reacciones inflamatorias, granulomas y úlceras en el sitio de inyección. El adyuvante 65 tiene la ventaja de que puede ser metabolizado, a diferencia de lo que sucede con el aceite mineral que utiliza el adyuvante de Freund (62). El Montanide es una familia de adyuvantes basados en aceite que se han usado experimentalmente en animales, utilizando antígenos sintéticos y recombinantes (63).

Derivados bacterianos

Las sustancias derivadas de bacterias presentan una potente capacidad inmunoestimuladora, por lo

que constituyen una fuente importante de adyuvantes. Las péptidoglicanas o lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas aumentan la RI de antígenos que son administrados conjuntamente, actividad que es mediada a través de la activación de los receptores de tipo *Toll* (TLRs) que median las señales de alerta, que estimulan el SI del hospedador (64). Los LPS son mitógenos de las células B, aunque también activan a las células T a producir IFN- γ y TNF, y por tanto aumentan la RI celular. El lípido A es el elemento responsable de su toxicidad y efecto adyuvante. El lípido A puede ser hidrolizado en condiciones de baja acidez, para obtener el lípido A monofosforilado, compuesto que retiene su efecto adyuvante y presenta una menor toxicidad (65). De las paredes bacterianas también se extrae la trehalosa dimicolato (TDM), que estimula la RI humoral y celular (66). Uno de los adyuvantes más potentes es el ADN de micobacteria, cuya actividad de adyuvante se correlaciona con su contenido elevado de motivos de CpG (67).

Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas que son liberadas por diferentes tipos de células en respuesta a un estímulo inmunológico, y que funcionan en la regulación de la RI y la homeostasis. Actualmente se conocen aproximadamente 50 citocinas con funciones únicas, así como redundantes. Estas proteínas tienen una vida media corta, de minutos, que actúan principalmente de manera autocrina o paracrina a concentraciones fisiológicas de nano o picomolas, a través de receptores específicos que se expresan en los subgrupos de leucocitos.

El GM-CSF, producido por monocitos, macrófagos y células T activadas, representa un adyuvante atractivo debido a sus propiedades de promover el desarrollo de granulocitos y macrófagos a partir de células precursoras derivadas de la médula ósea, así como un factor de crecimiento que promueve la generación y reclutamiento de células dendríticas en respuesta a estímulos inflamatorios externos. Asimismo, favorece la expresión de moléculas del MHC de clase I y II y de moléculas coestimuladoras sobre

las CPAs. El GM-CSF ha sido usado en la vacuna de la hepatitis B en pacientes en hemodiálisis (68).

La IL-2 aumenta la protección de manera significativa, incrementando preferentemente la RI celular. La IL-2 en liposomas se ha usado como adyuvante de antígenos de *Pseudomonas aeruginosa* administrados por vía nasal, aumentando drásticamente la formación de IgA en la mucosa y disminuyendo la mortalidad asociada con el desafío bacteriano (69). La IL-2 se ha utilizado como adyuvante para aumentar la potencia de la vacuna de la rabia inactivada (70). No obstante, la IL-2 ha mostrado una respuesta compleja, donde el tiempo de administración de la IL-2 es importante para aumentar la RI. Además, en algunos modelos experimentales con la vacuna del SIV, resultó en la expansión de células T CD8⁺ y células T supresoras CD4⁺ CD25⁺, y pérdida de células T CD4⁺ virus específicas, poniendo de manifiesto su naturaleza compleja (71, 72).

IL-4, citocina producida por células cebadas, células T y células de la médula ósea, es una citocina pleiotrópica que regula diversas respuestas de las células T y B, entre ellas la proliferación, supervivencia y expresión genética. Esta citocina es antagonista del IFN- γ y regula la diferenciación de las células T CD4⁺ inocentes hacia células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13, que favorecen la RI humoral, así como el cambio de isotipo de IgG1 a IgE (73). La IL-4 se ha utilizado como un adyuvante en vacunas de subunidades víricas, entre ellas del virus del herpes simple (HSV) de tipo 1 (74). Esta citocina aumenta la respuesta de tipo Th2, con formación de anticuerpos, principalmente de isotipos IgG1 e IgG3 frente al antígeno específico, con supresión de la actividad de CTL (75). En general, la IL-4 no representa un adyuvante efectivo en vacunas frente a patógenos que requieren de una respuesta de tipo Th1 (76).

IL-7 actúa sobre las células T y B; la producen principalmente las células fetales de hígado, y células de estroma de la médula ósea y timo, esenciales para el desarrollo de las células T y B. Su receptor lo expresan las células T, B, NK, dendríticas, monocitos, del epitelio intestinal y keratinocitos (77).

IL-12 es una citocina proinflamatoria que

induce la formación de IFN- γ y promueve el desarrollo de células Th1, constituyendo un enlace entre la inmunidad innata y la adquirida. La IL-12 se ha usado como estimulante de la RI frente a tumores (78-80).

IL-15 es producida principalmente por macrófagos y monocitos; actúa sobre células NK, NKT, y células T CD8+. La citocina estimula la inmunidad innata como la adquirida, y comparte con la IL-2 los receptores de señalización y activación (IL-2R β e IL-2R γ). Su administración aumenta la función y longevidad de células T CD8+ que son independientes en parte de la ayuda de las células T CD4+ (81).

IL-18, elaborada principalmente por monocitos, macrófagos y keratinocitos, es una citocina proinflamatoria cuyo blanco primario son las células T; su efecto fundamental es sobre las células T CD4+ Th1 y NK que producen IFN- γ , propiedad que es dependiente de una coestimulación sinérgica con IL-12. Además, induce la producción de IL-2, GM-CSF, y TNF- α . Asimismo, en monocitos y células NK induce la formación de quimiocinas e inhibe la producción de IgE por las células B. Estudios experimentales con vacunas del virus del herpes simple (HSV) de tipo 1 han demostrado que la IL-18 aumenta el desarrollo de CTL, la producción de anticuerpos IgG2a e IgG1 y la proliferación de células Th1 (82).

Estimulación de la mucosa

La mucosa es la puerta de entrada de patógenos, por lo que es necesario contar con adyuvantes que puedan estimular localmente la RI. El SI de las mucosas, caracterizado por la producción de anticuerpos IgA secretorios (IgAs) como el principal factor humoral de defensa, contiene tejido linfoide especializado, donde los antígenos son encontrados en el ambiente y captados para inducir respuestas de células B y T. Este evento es seguido de un éxodo de linfocitos específicos, que pueblan varios sitios efectores, como las regiones de la lámina propia y glándulas. Estas respuestas son reguladas por células T y citocinas, que conducen a la diferenciación de las células plasmáticas y producción subsecuente de

anticuerpos IgAs en secreciones externas (83). En general, es difícil la producción de anticuerpos en las mucosas por medio de la vacunación parenteral (84). No obstante, la eficacia en la inducción de la inmunidad de las mucosas depende de las propiedades fisicoquímicas del antígeno, del ambiente gastrointestinal, la presencia de adyuvantes, y el modo de estimulación. Se han usado diferentes metodologías, como conjugación química, inmunización con bacterias, virus recombinantes y adyuvantes de las mucosas. Los sistemas de vacunación por medio de polímeros naturales y sintéticos son particularmente prometedores (85).

Algunas bacterias patógenas tienen la capacidad de soslayar las dificultades de sistemas artificiales y ser captados fácilmente por los receptores específicos de las células M. Tal es el caso de la *Salmonella typhi* ty21a, que tiene una lectina que interactúa con los polisacáridos del receptor de las células M. En el mismo sentido, *Vibrio cholerae* y cepas del poliovirus pueden ser usados para la inmunización oral. Las cepas genéticamente modificadas de estos microorganismos se han usado como acarreadores de antígenos heterólogos (86). No obstante, una de las desventajas más relevante, es la inmunidad preexistente en un número importante de sujetos que han sido previamente inmunizados de manera natural o por inmunización.

Vacunas bacterianas

Difteria-tétanos y tosferina

La vacuna para prevenir la difteria, tétanos y tosferina (DPT) ha tenido un efecto benéfico, aunque no carente de reclamos. Las reacciones que generalmente se escuchaban eran fiebre elevada, colapso, convulsiones con o sin fiebre dentro de las primeras 48-72 horas. Aunque la eliminación de la toxicidad de las toxinas tetánica y diftérica es posible, no existe presión para su modificación. No sucede lo mismo con *Bordetella pertussis*, que tiene una reputación de ser reactogénico y de causar efectos colaterales más serios, aunque raros. La *B. pertussis* inactivada es irritante y causa reacciones locales y pirexia en una proporción

importante de infantes. Por esta razón, existía una demanda para generar una vacuna que no tuviera a la pertussis total muerta, sino antígenos puros derivados de la misma. Fue así como surgió la vacuna DPaT, que contiene los toxoides diftérico (DT) y tetánico (TT), más 3 antígenos de la pertussis, específicamente: toxoide pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y pertactina, adsorbida sobre sales de aluminio, con 2-fenoxietanol como preservativo. La vacuna contiene por cada 0.5 ml no menos de 30 UI DT, 40 UI TT, 25 µg de PT, 25 µg de FHA, y 8 µg de pertactina. Se administra por vía intramuscular. Las reacciones adversas son ligeras y aparecen durante las primeras 48 horas, caracterizadas por dolor, eritema, hinchazón o induración en el sitio de inoculación, ocasionalmente fiebre ligera. Rara vez se observa fatiga, indisposición, cefalea, artralgia, mialgia, urticaria, reacción anafilactoide, episodios hipotónicos y convulsiones dentro de las primeras 72 horas. Su eficacia protectora es de un 88%. La vacuna debe conservarse entre 2 y 8°C. Se recomiendan tres dosis primarias comenzando a las 6-8 semanas de edad, con intervalos de 4 semanas, al mismo tiempo de la vacuna oral de la poliomielitis (OPV). Asimismo, deben darse refuerzos a los 15-18 meses de edad, junto con la OPV, y a los 4-6 años, con el refuerzo de la OPV (87).

Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea ocasionada por *Salmonella typhi* causa anualmente la infección de cerca de 21 millones de habitantes y la muerte de más de 200,000 gentes alrededor del mundo. Algunas de los individuos que adquieren la tifoidea se convierten en portadores, quienes pueden difundir la enfermedad a otras personas. La enfermedad se transmite a través del agua o comida contaminada.

Se han desarrollado diferentes vacunas en contra de *S. typhi*. La oral obtenida de la cepa Ty21a, por mutagénesis, se administra cada tercer día hasta completar 4 dosis; las dosis de refuerzo para individuos que están expuestos a la enfermedad, se sugieren cada 5 años en la misma forma. Esta vacuna reduce la incidencia de la enfermedad en un 60 a 70%. La vacuna parenteral

se presenta en tres formas, a saber: vacuna inactivada con acetona y liofilizada o AKD, la forma inactivada con fenol y calor o H-P, y la vacuna que contiene el polisacárido Vi aislado de la cápsula del microorganismo o ViCP. La AKD y la H-P se consideran genéricamente equivalentes, aunque la vacuna H-P puede tener poco del importante antígeno Vi, lo que puede reducir su efecto protector. La eficacia observada en periodos de 2.5 a 3 años para la AKD varía de 75 a 94%, mientras que la de H-P fluctúa entre 61 a 77%. Las vacunas AKD y H-P no son equivalentes a la vacuna del polisacárido Vi, ni a la vacuna oral atenuada. La vacuna del polisacárido Vi reduce la incidencia de la tifoidea en un 49 a 87%. Cada una de ellas induce una inmunidad comparable y solo varían en los efectos colaterales que producen. La vacuna parenteral se administra en adultos y niños mayores de 10 años en dos dosis de 0.5 ml, subcutánea, espaciadas en al menos 4 semanas. En un estudio se demostró que después de tres años de la vacunación la eficacia era del 55%, con una elevación de anticuerpos importante y persistente (88). La AKD es la vacuna que causa con mayor frecuencia dolor en el sitio de inyección, mientras que la oral presenta menos efectos adversos.

Cólera

Se ha utilizado una vacuna oral de *Vibrio cholerae* muerta, que contiene una mezcla de las cepas Inaba y Ogawa y que ha mostrado una protección del 66%; se administra en dos dosis, la segunda entre los 7 y 30 días. Se ha usado también una vacuna atenuada CVD 103-HgR, por vía oral, elaborada por métodos de ADN recombinante de la cepa Inaba, en donde la subunidad A de la toxina de la bacteria ha sido eliminada, y la cual en voluntarios, ha mostrado inmunogenicidad y protección (89). Se han preparado vacunas con variantes deficientes en movilidad que son menos agresivas, aunque promisorias, y que se administran por vía oral en una sola dosis (90). También se cuenta con una vacuna inactivada, que se aplica por vía parenteral en dos dosis separadas por al menos 7 a 30 días, y que se refuerza cada 6 meses si el riesgo de adquirir la infección persiste.

Shigella

Las infecciones por *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, y *Shigella dysenteriae* constituyen un problema mundial que causan la muerte de más de medio millón de individuos anualmente. Cada una de ellas presenta diferentes serotipos, aunque algunos son los más frecuentes, como el 2a de *S. flexneri*. La *Shigella* es un germen intracelular facultativo que invade la mucosa del colon y recto, invadiendo las células M y las APCs; además, puede destruir las células linfoides. La infección induce una RI sistémica y de las mucosas. El LPS del microorganismo es importante, ya que induce una RI que protege en contra del desafío por la bacteria. Se presume que la inmunidad de las mucosas juega un papel relevante en la protección del hospedador, ya que la infección por *Shigella* permanece asociada con la mucosa del colon y rara vez se disemina a través de la ruta sistémica. Después de una infección natural en humanos se han encontrado, en secreciones locales, anticuerpos IgAs que constituyen la primera línea de defensa contra patógenos (91, 92).

Estudios epidemiológicos y en voluntarios indican que la inmunidad protectora frente a *Shigella* spp. se orienta hacia el antígeno O somático y es poco específica, lo que ha limitado el desarrollo de una vacuna efectiva. En estudios experimentales se ha observado que la respuesta de anticuerpos anti-O, se forman después de la infección con una cepa silvestre y del desafío (93). La administración pasiva de inmunoglobulina obtenida de leche de vaca con títulos elevados de anticuerpo anti-*S. flexneri*, protegió voluntarios contra el reto experimental con la cepa silvestre homóloga (94). La participación de la CMI parece tener un papel importante en la recuperación e inmunidad (95). Los candidatos para la elaboración de la vacuna son el polisacárido conjugado y vacunas viables atenuadas (96).

Helicobacter pylori

Las infecciones por *H. pylori* pueden producir una gran variedad de desordenes del tracto gastrointestinal alto, como gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma del tejido asociado a la mucosa

gástrica y carcinoma gástrico (97, 98). El microorganismo produce una de las enfermedades infecciosas crónicas más frecuentes en la actualidad, pudiendo afectar a cualquier estrato social, raza, sexo o grupo etario, aunque evidentemente con distinta frecuencia (99). Se desconoce porque la infección es silenciosa en la mayoría de los individuos infectados, donde la variación de la cepa puede ser un factor importante.

En modelos experimentales se ha observado que sonicados de *H. pylori* protegen en contra del desafío bacteriano (100). Se ha usado la citotoxina vacuolante (VaCA) y un antígeno asociado con la citotoxina (CagA), conjuntamente con adyuvantes bacterianos, con resultados alentadores (101).

Haemophilus influenzae

La enfermedad causada por *H. influenzae* es un padecimiento serio, que usualmente ataca niños menores de 5 años de edad. El germen se difunde de persona a persona. Antes de aparecer la vacuna Hib, la infección era la causa principal de meningitis bacteriana, que podía ocasionar daño cerebral permanente y sordera. *H. influenzae* causa también neumonía, severa hinchazón de garganta que dificulta la respiración, infecciones de la sangre, articulaciones, huesos, pericardio y muerte. Se han diseñado vacunas diversas de *H. influenzae*; la primera contra esta bacteria consistía del polisacárido de la cápsula, que tenía como desventaja el no comprometer a la célula T, dando lugar solamente a anticuerpos de la clase IgM de afinidad pobre, y a la cual no respondían infantes menores de 18 meses, dando como resultado que este grupo presentara la mayor incidencia de la enfermedad, ya que se encontraban desprotegidos, limitando la utilidad de la vacuna, por lo que fue abandonada (102).

La vacuna preparada con el poliribosilribitol fosfato (PRP) de la cápsula, mostró gran eficacia en infantes mayores de 18 meses, aunque nuevamente, no lo fue en menores de esta edad (103). No obstante, la PRP conjugada a acarreadores proteicos propicia la respuesta de las células T, que madura más rápidamente en el humano que la respuesta de polisacáridos T-

independientes. Los polisacáridos de diferentes tamaños se conjugaron con: toxoide diftérico (PRP-D), la variante de la toxina diftérica CRN₁₉₇₅, toxoide tetánico (PRP-T), o el complejo de la membrana externa del meningococo (PRP-OMP). Los diferentes conjugados mostraron una eficacia del 83%, resultados que han mejorado (104, 105). La vacunación con estas preparaciones ha disminuido dramáticamente la infección, y en muchos países la meningitis por este microorganismo no se presenta más, y lo más importante, que la vacuna funciona en los países en desarrollo (106).

Mycobacterium tuberculosis

El bacilo de la TB se adapta a vivir dentro de las células del hospedador, lo que desafía la eficacia de la RI. *M. tuberculosis* infecta a cerca de 2 billones de humanos, de los cuales una décima parte desarrolla la infección activa y cerca de 3 millones muere anualmente; además, existen cepas del microorganismo que presentan resistencia a los agentes antimicrobianos (107).

La vacuna BCG fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur de Lille en 1919, cuando ellos observaron después de varios años, que el bacilo cultivado en una mezcla de glicerina-bilis-papa perdía virulencia, hasta convertirse en una cepa atenuada incapaz de causar TB en animales de experimentación. Esta preparación se consideró útil para ser usada como vacuna en humanos (108). Después de algunos tropiezos, fue finalmente usada después de la II Guerra Mundial. El BCG parece mostrar su mejor eficacia en prevenir la TB miliar y la meningitis tuberculosa de infantes, aunque su eficacia en la forma pulmonar parece ser variable. Su capacidad para prevenir la TB en adultos es motivo de discusión, y en algunos países como USA no se utiliza en este grupo, particularmente porque se cuenta con la prueba de Mantoux y además porque se puede diagnosticar, sin dejar de mencionar que es una enfermedad rara en esa población (109). Se han postulado una serie de razones para explicar la variación en la eficacia de la BCG, entre otras: variación genética de la cepa de BCG (110), variación genética de la población (111),

interferencia por micobacterias no tuberculosas (112), e interferencia por infecciones parasitarias concurrentes (113).

Mycobacterium leprae

Mycobacterium leprae agente causal de la lepra, conocida también con enfermedad de Hansen, es una enfermedad infecciosa crónica, que involucra principalmente a la piel, tracto respiratorio superior, testículos, ojos, y segmentos superficiales de los nervios periféricos (114). *M. leprae* comparte muchas de sus propiedades biológicas con *M. tuberculosis*, por lo que se ha utilizado el BCG como vacuna para proteger en contra de la lepra, la cual es parcialmente efectiva. Convit (115) fue el primero en utilizar una vacuna de *M. leprae* muerto, obtenido del armadillo y BCG vivo. Asimismo, se ha utilizado una micobacteria conocida como *Mycobacterium w* como otra potencial vacuna, la cual es cultivable, de crecimiento rápido, que semeja pero no es idéntica a *M. leprae*. Con *Mycobacterium w* se han realizado trabajos de campo de fase I y a gran escala, donde cerca de un centenar de pacientes leprosos con múltiples bacilos, y un número igual de enfermos controles, recibieron por vía intradérmica 10^9 bacilos muertos, seguidos de 7 dosis de 5×10^8 bacterias en intervalos de 3 meses. Además, ambos grupos recibieron tratamiento con drogas terapéuticas. Los pacientes vacunados mostraron una limpieza bacteriológica más completa y rápida, una acelerada regresión clínica de las lesiones, y una mayor conversión a la prueba de lepromina (116). Se ha descrito también una vacuna de BCG recombinante que produce un antígeno protector, el componente A del complejo antigénico 85 (Ag85A), que ha mostrado en animales de experimentación una reducción en la multiplicación del bacilo (117).

Vacunas virales

Hepatitis A

La hepatitis A es una enfermedad hepática aguda, usualmente autolimitante causada por el virus de la hepatitis A (VHA). El VHA es transmitido de persona a persona, principalmente a través de la

ruta fecal-oral. La infección con el VHA induce la formación de anticuerpos protectores que persisten de por vida (118). El efecto defensor ha sido demostrado por estudios de inmunización pasiva con globulina inmune, que protege de 3 a 5 meses (119). Actualmente se conocen cuatro vacunas inactivadas, las cuales son efectivas e inocuas. Ningunas de ellas se recomienda para menores de un año de edad. En países donde la hepatitis A presenta una alta endemia, casi todas las personas han sido infectadas durante la infancia con el virus sin mostrar síntomas, previniendo de forma efectiva el padecimiento. En estos países, programas de vacunación a gran escala no son recomendables. En aquellos países donde la enfermedad presenta una endemia intermedia, y la proporción relativamente grande de la población adulta es susceptible al VHA, y el padecimiento representa una carga importante de salud pública, se puede considerar una vacunación a gran escala, junto con educación sanitaria y mejoras en la sanidad. No obstante, en regiones de baja endemia, la vacunación frente al VHA es indicada para individuos de alto riesgo, como los que viajan a lugares de endemia intermedia o elevada (119, 120).

Las vacunas desarrolladas contienen virus inactivo, y son igualmente eficaces. Se administran por vía parenteral, en una serie de dos dosis, separadas por 6-18 meses. Las dosis y esquemas de vacunación varían de acuerdo al fabricante. Tres de ellas se obtienen de virus adaptados a cultivos de células, de donde se purifican, se inactivan con formalina y se adsorben en adyuvante de hidróxido de aluminio. La cuarta vacuna se prepara en cultivo de células diploides humanas infectadas, de donde el virus se purifica e inactiva con formalina, y se adsorbe a partículas biodegradables de fosfolípido de 150 nm, fortalecido con hemaglutinina del virus de la influenza y neuraminidasa. En los vacunados estos virosomas se cree estimulan CPA y macrófagos previamente sensibilizados, estimulando una respuesta rápida que induce la proliferación de células T y B en los vacunados. Se ha aprobado una vacuna combinada del VHA inactivado y un recombinante de la hepatitis B para uso en niños de 1 año y mayores, en tres dosis, usando esquemas de

0, 1 y 6 meses. Las vacunas son muy inmunogénicas y cerca del 100% de los inmunizados desarrollan niveles protectores de anticuerpos en el primer mes, después de una sola dosis de la preparación; su eficacia se ha demostrado en el rango de 82%-100% (119, 120).

Hepatitis B

El VHB causa una infección hepática que pone en peligro la vida del individuo infectado, ya que con frecuencia da lugar a enfermedad hepática crónica, con un riesgo elevado de muerte por cirrosis hepática y cáncer hepático. Se estima que dos billones de humanos están infectados con el VHB, y más de 350 millones tienen infecciones crónicas del hígado (121).

La vacuna frente al VHB, disponible desde 1982, contiene una de las proteínas de la cubierta del virus, el denominado antígeno de superficie (HBsAg). La vacuna se prepara a partir de donadores de plasma sanos, portadores del VHB. Esta fuente poco usual, es debida a que el virus no crece en los medios habituales de laboratorio. Del plasma se concentra el antígeno de superficie por precipitación con sulfato de amonio, seguido de bandeado isopícnico y centrifugación de zona, purificación, tratamiento con formalina, adsorción sobre aluminio y preservación con timerosal (122, 123). La vacuna obtenida del plasma es una de las mejores que se han desarrollado. No obstante, y debido a la preocupación causada por la epidemia de VIH/SIDA reconocida en junio de 1981, justamente 5 meses antes de que la vacuna fuera aprobada por la FDA, la comunidad médica perdió entusiasmo en su utilización (124).

Se ha preparado una vacuna recombinante del VHB. La vacuna se ha diseñado por ingeniería genética, y es producida en lavaduras, en donde una porción del gen que codifica el HBsAg ha sido insertado. Esta cubierta externa no es infecciosa, pero proporciona inmunidad contra el virus. El antígeno es cosechado y purificado de los cultivos de fermentación de un cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene el gen para el subtipo *adw* del HBsAg. La proteína HBsAg es liberada de las levaduras por sonicación de las células y purificada por una serie de métodos

físicos y químicos. La proteína purificada es tratada con formaldehído en un amortiguador de fosfatos y después coprecipitada con sulfato doble de potasio y aluminio, que constituye la vacuna que se mezcla con el adyuvante de sulfato hidroxifosfato de aluminio. La vacuna contiene menos del 1% de la proteína de levadura, y no tiene ADN; además, presenta una eficacia comparable a la obtenida del plasma, y ofrece la ventaja de que se encuentra libre de productos sanguíneos. La vacuna se administra por vía intramuscular (músculo deltoides), en dosis de 5 µg/ml para uso pediátrico, 10 µg/ml para adultos, y 40 µg/ml para pacientes en pre- o en diálisis. El régimen recomendado es de tres dosis: en la fecha seleccionada, 1, y 6 meses (125-126). Aquellos pacientes que presentan síntomas sugerentes de hipersensibilidad después de una inyección de la vacuna, no deben recibir más inyecciones de la misma. También se puede presentar (1%) dolor en el sitio inyectado, prurito, eritema, hinchazón, y formación de nódulo. El malestar más frecuente incluye fatiga, debilidad, cefalea, fiebre, náusea, diarrea, y faringitis. Asimismo, se ha reportado que la inmunización con esta vacuna se asocia con un riesgo aumentado de esclerosis múltiples (127). No obstante, otros estudios han negado esta posibilidad (128)

Rotavirus

Los rotavirus producen diarrea en infantes y niños. El virus causa anualmente la muerte de 352.000-592,000 y la hospitalización de 2 millones de niños menores de 5 años, siendo los más afectados aquellos de los países más pobres (82%) (129, 130). Se ha ensayado una vacuna de rotavirus humano atenuada de la cepa RIX4414, en fase 3, en cerca de 20,000 infantes (131). La eficacia de la vacuna en contra de gastroenteritis severa y hospitalización asociada al rotavirus fue del 85%. La hospitalización por diarrea fue reducida en un 42%. Sin embargo, durante la ventana de 31 días después de cada dosis, se observó intususcepción en 6 receptores de la vacuna y en 7 que recibieron placebo. Las dos dosis orales de la vacuna atenuada fueron muy eficaces en proteger infantes en contra de gastroenteritis severa causada por

rotavirus y no fueron asociadas con un riesgo aumentado de intususcepción (132).

Parotiditis

La primera vacuna contra la parotiditis fue desarrollada en 1949, con el virus muerto, que tenía un efecto benéfico corto, debido a que la inducción de memoria inmunológica era baja. La utilización del germen vivo pero atenuado ha dado mejores resultados. La vacuna se ha preparado a partir de diferentes cepas virales, la más utilizada es la cepa Jeryl Lynn que induce la formación de anticuerpos neutralizantes, que no decaen substancialmente después de tres años de la vacunación, y que muestra una eficacia del 94%. El virus se crece en un medio de cultivo que contiene un amortiguador, vitaminas, aminoácidos y enriquecido con suero fetal bovino; además tiene sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina humana como estabilizador y neomicina. La vacuna se administra por vía subcutánea, en dosis de 0.5 ml que posee no menos de 20,000 dosis infecciosas del cultivo de tejidos (TCID₅₀) (133, 134).

Sarampión

El sarampión es una enfermedad altamente infecciosa que se transmite por la ruta respiratoria y que se caracteriza por fiebre y eritema, con complicaciones importantes como infecciones secundarias debida a la inmunosupresión que causa el virus, y además encefalomielitis. La vacuna del sarampión se preparó de una cepa aislada en 1954 de un niño de apellido Edmonston. La cepa era muy virulenta y hubo que pasarla cientos de veces hasta obtener una cepa de tercera generación más atenuada, que es la usada actualmente. La vacuna se administra generalmente entre los 9 y 15 meses de edad. La seroconversión a los 9 meses es del 85% y a los 12 meses del 95%. La seroconversión en infantes más jóvenes es impedida por el anticuerpo transferido por la madre y la inmadurez del sistema inmune (135). Una segunda dosis de la vacuna refuerza la protección e impide la transmisión viral endémica (136).

Rubéola

La rubéola se presenta generalmente como un exantema moderado en la niñez. Sin embargo, el feto acarreado por una mujer embarazada no inmune puede ser seriamente dañado si ella contrae la enfermedad durante el primer trimestre y posiblemente durante el segundo. En consecuencia, se ha tratado de impedir que las mujeres en edad de procrear y que no son inmunes a la rubéola, estén desprotegidas, así como de disminuir la incidencia de la enfermedad natural en los niños, por medio de la elaboración de vacunas vivas atenuadas eficaces. Una de las cepas atenuadas utilizadas, la Cendehill, ha mostrado ser efectiva e inocua como agente inmunizante en niños (137). Actualmente se utiliza la cepa RA 27/3 desarrollada en cultivos primarios de pulmón embrionario humano. La vacunación produce anticuerpos en más del 95% de los individuos inmunizados (138), los cuales persisten de 11 a 15 años, con un patrón similar al observado en la infección natural, aún en ausencia de exposición al virus de la rubéola (139). La vacunación en niños rara vez presenta síntomas indeseables. Eventualmente se advierte eritema, linfadenopatía, febrícula, y síntomas respiratorios superiores (140, 141). En adultos se han manifestado artralgias y artritis. Ocasionalmente se muestra artralgia crónica o recurrente, algunas veces con artritis o síntomas neurológicos (142, 143).

Parotiditis, sarampión, rubéola

La vacuna triple frente a la parotiditis, sarampión y rubéola, también denominada MMR por sus siglas en inglés, es una mezcla de los tres virus vivos pero atenuados que producen esas infecciones. Los componentes de la MMR se obtienen por propagación en células animales y humanas, ya que los virus requieren de células para su replicación. Los de la parotiditis y sarampión crecen en cultivos de células de embriones de pollo, mientras que el de la rubéola, como ya se indicó, se propaga en líneas de células humanas. Su administración por vía subcutánea se lleva a cabo el primer año de vida, con otra dosis un mes

después, o a los 4-5 años de edad, para asegurar que los que no respondieron a la primera lo hagan la segunda vez (144). La vacuna ha mostrado gran efectividad e inocuidad, y de gran ayuda en los esfuerzos para la erradicación del sarampión y la reducción de la morbilidad y mortalidad asociada con parotiditis y rubéola (145). Se pueden presentar reacciones adversas ligeras, como fiebre, malestar y eritema, y desarrollar en un número reducido de casos, dolores articulares (146). Las mujeres adultas son más propensas a presentar dolores articulares, artritis aguda y algunas veces artritis crónica (147). Las reacciones anafilácticas causadas por alergia al huevo, son extremadamente raras, aunque severas (148). La vacuna triple que usa la cepa Urabe del virus de la parotiditis ha presentado un número reducido de trastornos neurológicos (147), por lo que algunos países utilizan la cepa Jeryl Lynn. No obstante, la MMR que contiene la cepa Urabe muestra mayor eficacia, efectos colaterales más suaves, y una incidencia reducida de eventos adversos (149). Las implicaciones de la vacuna triple en la inducción de autismo han sido descartadas (150).

Recientemente se ha incluido al virus de la varicela-Zoster en la vacuna MMR (MMRV) (145), para uso en niños con edades entre 12 meses y 12 años. La primera dosis se recomienda entre los 12-15 meses de edad, que se suplementa con una segunda inyección entre los 4-6 años después. La MMRV actualmente solo se aplica en USA y se espera que esté disponible en el presente año en otros países. La MMRV presenta ataques febriles después de la primera dosis, aunque esta característica no difiere de manera significativa de la observada cuando se administran la MMR y la de varicela separadas (151).

Varicela-Zoster

El virus de la varicela-Zoster (VZV) posee un ADN de doble cadena que pertenece a la familia de los virus herpes. Se conoce un solo serotipo y el humano es el único reservorio. El VZV infecta al hospedador a través de la mucosa nasofaríngea, e invariablemente produce enfermedad en individuos susceptibles. El periodo de incubación de la enfermedad es de 14-16 días, y causa en

infantes una infección que produce fiebre, eritema cutáneo, y ampollas llenas de fluido sobre la piel. La enfermedad es usualmente suave, aunque puede ser seria o aun fatal en infantes jóvenes y en adultos. El virus puede causar severas infecciones de la piel, problemas respiratorios, daño cerebral, o muerte. Después de la varicela, el virus persiste en los nervios sensoriales de los ganglios, de donde puede ser ulteriormente reactivado y causar herpes zoster (culebrilla), que generalmente causa dolor severo en nervios, y problemas de audición o visión, que pueden durar meses o años. La infección es transmitida de persona a persona a través de aerosoles o por contacto con los fluidos de las ampollas de la varicela (152).

La vacuna se usa en niños mayores de 1 año y adultos, en una serie de inyecciones, la primera entre los 12 y 15 meses, y el refuerzo entre los 4 y 6 años de edad, o al menos 3 meses después de la primera dosis. No se recomienda el uso de salicilatos, como aspirina, disalcid, dolobid, salflex, tricosal u otros a menores de 18 meses, por al menos 6 semanas después de que ha recibido la vacuna de la varicela. Se ha reportado la aparición del síndrome de Reye (encefalopatía aguda) (153) en quien ha recibido estos medicamentos. No se debe administrar a individuos: alérgicos a la gelatina, o neomicina; con tuberculosis activa, síndrome de Guillain-Barré (polirradiculoneuritis), asma, diabetes, enfermedad renal, o trastornos de la sangre, como anemia o inmunodeficiencias; que se encuentran bajo tratamiento con esteroides, quimioterapia, radiaciones; que han recibido recientemente un trasplante, o en mujeres embarazadas (154).

La vacuna frente al VZV se prepara con la cepa denominada OKA, que ha sido modificada a través de la propagación secuencial de diferentes cultivos celulares (155). Después de una sola dosis, se observa una seroconversión de aproximadamente el 95% de niños sanos. La vacunación simultánea de varicela con otras vacunas es inocua e inmunogénica, y es similar en respuesta a la que se observa cuando se administran separadas por semanas. Sin embargo, cuando se incluye en una vacuna tetravalente (MMRV) tiene que aumentarse la dosis. La inmunidad frente a la vacuna de VZV dura por lo

menos de 10-20 años (156-158). Es posible que la CMI también juegue un papel importante en la prevención de la varicela, ya que niños que no muestran seroconversión son protegidos de la varicela y desarrollan solamente una enfermedad muy suave (159). Esto sugiere que el anticuerpo que se forma después de la vacunación no es esencial, ya que niños seronegativos pueden tener protección frente al virus y no presentar una enfermedad severa (160).

Influenza

El virus de la influenza es un virus ARN que infecta a mamíferos y aves, constituido por tres géneros, específicamente: A, B y C. Los virus del tipo A son los patógenos humanos más virulentos y que causan la enfermedad más severa. El virus de la influenza A se subdivide en varios serotipos basados en su respuesta de anticuerpos (161). Los serotipos que se han reportado en humanos, y responsables de las pandemias más relevantes son: H1N1, *flu* Español en 1918, y de la denominada “porcina” de 2009; H2N2, responsable en Asia en 1957; H3N2, de Hong Kong en 1968.

El genoma del virus de la influenza A tiene 11 genes que codifican 11 proteínas. La hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son las dos grandes glicoproteínas localizadas en la parte externa de la partícula viral. La HA es una lectina que participa en el enlace del virus a las células blanco y la entrada del genoma viral dentro de las mismas, mientras que la NA esta involucrada en la liberación de la progenia viral de las células infectadas, al degradar los azúcares que enlazan las partículas virales maduras. Los virus de la influenza A se clasifican en subtipos basados en la respuesta de anticuerpos hacia la HA y NA. Los diferentes tipos de HA y NA forman la base de su distinción, por ejemplo, H1N1. Se conocen varios subtipos, 16 de H y 9 de N, de los cuales en el humano solo se han encontrado H1, 2 y 3, y N1 y 2 (162).

Cada año el virus de la influenza cambia y diferentes cepas se vuelven dominantes. Debido a la mutación elevada del virus, una vacuna particular es efectiva, cuando mucho, por un año. En consecuencia, la OMS coordina el contenido de

la misma anualmente. La vacuna correspondiente al 2009 contiene virus de los tipos H1N1, H3N2, y B/Florida/4/2006.

La vacuna de la influenza se prepara en huevos de pollo fertilizados, por lo que no se deben administrar a las personas alérgicas al huevo o con historia de síndrome de Guillain-Barré. Los anticuerpos formados en respuesta a una vacuna de una cepa del virus de la influenza pueden proporcionar protección contra cepas diferentes, aunque relacionadas, y prevenir o disminuir la enfermedad y sus complicaciones.

La vacunación se recomienda en miembros de grupos de alto riesgo, entre ellos niños y jóvenes. La inmunización proporciona cerca del 75% de efectividad, previniendo la hospitalización por complicaciones. Las vacunas anuales presentan generalmente una buena correlación con las cepas circulantes. Las vacunas constituyen una de las formas más efectivas para proteger a la población de contraer la enfermedad durante una pandemia o epidemia de influenza. Desde luego, otras medidas de protección y tratamiento incluyen drogas antivirales, aislamiento social e higiene personal, las que deben ser llevadas a cabo antes del desarrollo de una vacuna frente a un virus causante de una pandemia, y después de la disponibilidad de la misma. El desarrollo de la vacuna en contra del virus de la influenza A (H1N1) causante de la pandemia que actualmente nos afecta y que fue identificada en el mes de Abril del 2009, se encuentra en su etapa final y se espera su terminación en el presente año.

Las vacunas se encuentran disponibles en forma inyectable o como aerosol nasal. La inyectable contiene virus inactivado de las cepas A/H1N1, A/H3N2, y B, que inducen la formación de anticuerpos protectores. La nasal consiste de un virus de influenza atenuado, que ha sido modificado genéticamente para minimizar los síntomas de la enfermedad; esta forma no es recomendable para menores de 2, o mayores de 50 años, ya que funciona infectando al organismo. En estudios llevados a cabo en reclutas, se ha observado que la vacuna inyectada ocasiona una menor incidencia de trastornos relacionados con neumonía e influenza, cuando se compara con grupos que recibieron la nasal o que no fueron

inmunizados. No obstante, la vacuna nasal contra cepas pandémicas puede ser más eficaz que la forma inactivada, debido a que la población puede seguramente carecer de inmunidad. Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que, en poblaciones adultas que han recibido inmunizaciones previas, la vacuna inyectable puede ser más efectiva que la nasal en la prevención de la morbilidad relacionada con neumonía e influenza. La vacuna atenuada puede ser más apropiada para aquellos individuos que no han sido previamente inmunizados (163).

Conclusiones

La inmunización constituye la forma de generar una RI que es necesaria para la protección en contra de diversas infecciones. Por tanto, el conocer la forma de regularla es uno de los objetivos más importantes actualmente en estudio, particularmente cuando se trata de la elaboración de vacunas. El uso de ellas ha mostrado que es posible no solo prevenir las enfermedades causadas por agentes infecciosos, sino eliminarlas, como es el caso de la viruela, y el otro, en proceso, el de la poliomielitis. Desde luego, es necesario no solo contar con una vacuna efectiva, y que en la biosfera no exista un animal u otro reservorio, sino además con un compromiso genuino de todo el mundo, en particular de los gobiernos, para lograrlo. No menos importante, es el desarrollo de nuevas tecnologías que proporcionen mejores vacunas, con menos efectos colaterales. En este sentido la biología molecular facilita la elaboración de vacunas más puras, y la inmunología nos orienta en la forma en la cual estas interactúan con el sistema inmune.

Correspondencia: Dr. Librado Ortiz-Ortiz, e-mail: orlizfl@hotmail.com

Referencias

1. Zambrano-Villa, S.A. Inmunización. *En*, Inmunología Básica y Clínica. S.A. Zambrano-Villa, ed. McGraw-Hill Panamericana, México. 2007. pp. 371-384.
2. Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., et al. 1988. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health

- Organization. pp. 1460.
3. Silverstein, A.M. 1989. A History of Immunology. Academic Press: San Diego.
 4. Rodrigues, L.C., Diwan, V.K., Wheeler, J.G. 1993. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and military tuberculosis: a meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* 22:1154-1158.
 5. Glenny, A.T., Hopkins, B.E., 1923-1924. Diphteria toxoid as an immunising agent. *Brit. J. Exp. Pathol.* 4:283-288.
 6. Enders, J.F., Weller, T.H., Robbins, R.C. 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109:85-87.
 7. Treanor, J. 2006. The Cutter incident: how America's first polio vaccine led to the growing vaccines crisis. *Environ. Health Perspect.* 114:A556.
 8. Graham, B.S., Crowe, J.E.Jr. Immunization against viral diseases. *En, Fields Virology*, D.M. Knipe, ed. 5th Ed. Vol. I. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 487-538.
 9. Foege, W.H. 1998. Commentary: smallpox eradication in West and Central Africa revisited. *Bull. World Health Org.* 76:233-235.
 10. Glück, R. 2000. Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes. *En, Methods in Molecular Medicine, Vaccine Adjuvants.* vol 42. D.T. O'Hagan, ed. Humana Press, Inc. Totowa, N.J. pp. 151-178.
 11. Esser, M.T., Marchese, R.D., Kierstead, L.S. et al. 2003. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 21:419-430.
 12. Vaccari, M., Trindade, C.J., Venzon, D., et al. 2005. Vaccine-induced CD8⁺ central memory T cells in protection from simian AIDS. *J. Immunol.* 175:3502-3507.
 13. Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S.M., Scott, P. 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat. Med.* 10:1104-1110.
 14. Badgett.M.R., Auer, A., Carmichael, L.E., et al. 2002. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J. Virol.* 76:10524-10529.
 15. Nossal, G.J.V. 2008. Vaccines. *En, Fundamental Immunology.* Paul, W.E., ed., 6th Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 1233-1290.
 16. Pizza, M., Fontana, M.R., Giuliani, M.M., et al. 1994. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* 180:2147-2153.
 17. Yogev, R., Arditi, M., Chadwick, E.G., et al. 1990. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate): immunogenicity and safety at various doses. *Pediatrics* 85:690-693.
 18. Dominguez, S.R., Daum, R.S. 2003. Toward global *Haemophilus influenzae* type b immunization. *Clin. Infect. Dis.* 37:1600-1602.
 19. Zuckerman, J.N. 2006. Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:456-459.
 20. Sesardic, D. 1993. Synthetic peptide vaccines. *J. Med. Microbiol.* 39:241-242.
 21. Moss, B., Flexner, C. 1987. Vaccinia virus expression vectors. *Annu. Rev. Immunol.* 5:305-324.
 22. Perkus, M.E., Piccini, A., Lipinskas, B.R., Paoletti, E. 1985. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science* 229:981-984.
 23. Ramshaw, I.A., Andrew, M.E. Phillips, S.M., et al. 1987. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia/IL-2 recombinant infection. *Nature* 329:545-546.
 24. Andrew, M.E., Coupar, B.E.H., Ada, G.L., Boyle, D.B. 1986. Cell-mediated immune response to influenza virus antigen expressed by vaccinia virus recombinants. *Microb. Path.* 1:443-452.
 25. Moss, B., Carroll, M.W., Wyatt, L.S., et al. 1996. Host range restricted, non-replicating, vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv. Exp. Med. Med.* 397:7-13.
 26. Robinson, H.L., Pertmer, T.M. 2000. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv. Virus Res.* 55:1-74.
 27. Tang, D. Devit, M., Johnston, S.A., et al. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154.
 28. Satterlee, B. 2008. Production of H5N1 avian influenza virus vaccine by plasmid-based reverse genetics technology. *MMG 445 Basic Biotechnol. eJ.* 4:93-98.
 29. Letvin, N.L., Huang, Y., Chakrabarti, B.K., et al. 2004. Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in Rhesus monkeys. *J. Virol.* 78:7490-7497.
 30. Kim, J.J., Nottingham, L.K., Oh, J., et al. 1999. Rational vaccine design through the use of molecular adjuvants. *Gene Ther. Mol. Biol.* 3:157-165.
 31. Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., Howard, J.A. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 56:473-484.
 32. Ma, J.K., Vine, N.D. 1999. Plant expression systems for the production of vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236:275-292.
 33. Cramer, C.L., Boothe, J.G., Oishi, K.K. 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*

240:95-118.

34. Arakawa, T., Chong, D.K.X., Merrit, J.L., Langridge, W.H.R. 1997. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res.* 6:403-413.
35. Mason, H.S., Arntzen, C. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11745-11749.
36. Mason, H.S., Warzecha, H., Mor, T., Arntzen, C.J. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 8:324-329.
37. Thanavala, Y., Huang, Z., Mason, H.S. 2006. Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev. Vaccines* 5:249-260.
38. McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M., et al. 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (NY)* 13:1484-1487.
39. Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.M., et al. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5335-5340.
40. Tacket, C.O. 2009. Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 332:103-117.
41. Freund, J., Casals-Ariet, J., Genghof, D.S. 1940. The synergistic effect of paraffin-oil combined with heat-killed tubercle bacilli. *J. Immunol.* 38:67-69.
42. Freund, J. 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl. Tuberc., Basel* 10:130.
43. Vogel, F.R., Powell, M.F. 1995. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Pharm. Biotechnol.* 6:141-228.
43. Shirodkar, S., Hutchinson, R.L., Perry, D.L., et al. 1990. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Vaccine* 7:1282-1288.
44. Burrell, L.S., Johnston, C.T., Schulze, D., et al. 2000. Aluminum phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. *Vaccine* 19:275-281.
45. Johnston, C.T., Wang, S.L., Hem, S.L. 2002. Measuring the surface area of aluminum hydroxide adjuvant. *J. Pharm. Sci.* 91:1702-1706.
46. Jones, L.S., Peek, L.J., Power, J., et al. 2005. Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens. *J. Biol. Chem.* 280:13406-13414.
47. Helenius, A., von Bonsdorff, C.H. 1976. Semliki Forest virus membrane proteins, preparation and characterization of spike complexes soluble in detergent-free medium. *Biochim. Biophys. Acta.* 436:895-899.
48. Shek, P.N., Yung, B.Y.K., Stanacev, N.Z. 1983. Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology* 39:37-40.
49. Allison, A.C., Gregoriadis, G. 1974. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 252:252-258.
50. Heath, T.D., Edwards, D.C., Ryman, B.E. 1976. The adjuvant properties of liposomes. *Biochem. Soc. Trans.* 4:49-52.
51. Tyrrel, D.A., Heath, T.D., Colley, C.M., Ryman, B.E. New aspects of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 457:259-263.
52. van Rooijen, N., van Nieuwmegen, R. 1983. Use of liposomes as biodegradable and harmless adjuvants. *Meth. Enzymol.* 93:83-85.
53. Alving, C.R. 1995. Liposomes as vehicles for vaccines: Induction of humoral, cellular, and mucosal immunity. *En, Handbook of Natural Toxins: Bacterial Toxins and Virulence Factors in Disease*, J. Moss, B. Iglewski, M. Vaughan, A. T. Tu, eds. vol. 8. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 47-58.
54. Allison, A.C. 1998. The mode of action of immunological adjuvants. *Dev. Biol. Stand.* 92:3-11.
55. Gregoriadis, G., McCormack, B., Obrenovic, M., et al. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *En, Methods in Molecular Medicine*, vol. 42. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research protocols. D.T. O'Hagan, ed. Humana Press, Inc. Totowa, N.J. pp. 137-150.
56. Mengiardi, B., Berfer, R., Just, M. 1995. Virosomes as carriers for combined vaccines. *Vaccine* 13:1306-1315.
57. Kapczynski, D.R., Tumpey, T. 2003. Vaccination efforts with virosomes produced from Newcastle Disease Virus. *Western Poultry Disease Conference Proceedings*, p.33.
58. Mischler, R., Metcalfe, I.C. 2002. Inflexal (R) V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine* 20 suppl. 5:B17-23.
59. Okawa, Y., Howard, C.R., Steward, M.W., 1992. Production of antipeptide antibody in mice following immunization of mice with peptides conjugated to mannan. *J. Immunol. Methods* 142:127-131.
60. Kreuter, J., Haenzel, I. 1978. Mode of action of immunological adjuvants: some physicochemical factors influencing the effectivity of polyacrylic adjuvants. *Infect. Immun.* 19:667-675.
61. Byars, N.E., Allison, A.C. 1990. Immunologic adjuvants:

- general properties, advantages, and limitations. *En, Laboratory Methods in Immunology*. H. Zola, ed. Boca Raton: CRC Press. pp. 39-51.
62. Hilleman, M.R., Woodhour, A.F., Friedman, A., Phelps, A.H. 1972. Studies for safety of adjuvant 65. *Ann. Allergy* 30:477-483.
63. Jones, G.L. 1990. Peptide vaccine derived from a malaria surface antigen: effect of dose and adjuvant on immunogenicity. *Immunol. Lett.* 24:253-260.
64. Audibert, F.M., Lise, L.D. 1993. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today* 14:281-284.
65. Tomai, M.A., Johnson, A.G. 1989. T cell and interferon- γ involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin. *J. Biol. Resp. Modifiers* 8:625-630.
66. Lemaire, G., Tenu, J.P., Petit, J.F., Lederer, E. 1986. Natural and synthetic trehalosa diesters as immunomodulators. *Med. Res. Rev.* 6:243-274.
67. Weiner, G.J., Hsin-Ming, L., Wooldridge, J.E., et al. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10833-10837.
68. Sasaki, M.G., Foccacia, R., De Messias-Reason, I.J. 2003. Efficacy of granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) as a vaccine adjuvant for hepatitis B virus in patients with HIV infection. *Vaccine* 21:4545-4549.
69. Abraham, E., Shah, S. 1992. Intranasal immunization with liposomes containing IL-2 enhances bacterial polysaccharide antigen-specific pulmonary secretory antibody response. *J. Immunol.* 149:3719-3726.
70. Nunberg, J.H., Doyle, M.V., York, S.M., York, C.J. 1989. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4240-4243.
71. Calarota, S.A., Weiner, D.B. 2004. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunol. Rev.* 199:84-99.
72. Nacsa, J., Edghill-Smith, Y., Tasi, W.-P., et al. 2006. Contrasting effects of low-dose IL-2 on vaccine-boosted simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in macaques chronically infected with SIV mac25. *J. Immunol.* 174:1913-1921.
73. Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796-3806.
74. Spits, H. 1992. IL-4: Structure and Function. CRC Press, Boca Raton, FL.
75. Kim, J.J., Yang, J.-S., VanCott, T.C., et al. 2000. Modulation of antigen-specific humoral responses in rhesus macaques by using cytokine cDNAs as DNA vaccine adjuvants. *J. Virol.* 74:3427-3429.
76. Michel, M.L., Loirat, D. 2001. DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B. *Intervirology* 44:79-87.
77. Fry, T.J., Mackall, C.L. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol.* 174:6571-6576.
78. Kang, W.K., Park, C., Yoon, H.L. et al. 2001. Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblast: outcome of a phase I study. *Hum. Gene Ther.* 12:671-684.
79. Jager, E., Jager, D., Knuth, A. 2003. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int. J. Cancer* 106:817-820.
80. Egilmez, N.K., Jong, Y.S., Sabel, M.S., et al. 2000. In situ tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer Res.* 60:3832-3837.
81. Kutzler, M.A., Robinson, T.M., Chattergoon, M.A., et al. 2005. Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *J. Immunol.* 175:112-123.
82. Zhu, M., Xu, X., Liu, H., et al. 2003. Enhancement of DNA vaccine potency against herpes simplex virus 1 by co-administration of an interleukin-18 expression plasmid as a genetic adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 52:223-228.
83. McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., et al. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10:75-88.
84. Bye, W.A., Allan, C.H., Trier, J.S. 1984. Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86:789-801.
85. Shalaby, W.S.W. 1995. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74:127-134.
86. Mekalanos, J.J. 1992. Bacterial mucosal vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 327:43-50.
87. WHO. 2002. Core information for the development of immunization policy. WHO-Vaccines and Biologicals. Update on immunization policies, guidelines and recommendations. *Indian Ped.* 41:239-244.
88. Klugman, K.P., Koornhof, H.O., Robbins, J.B., Cam,

- N.N. 1996. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* 14:435-438.
89. Kotloff, K.L., Wasserman, S.S., O'Donnell, S., et al. Safety and immunogenicity in North Americans of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR: results of a randomized, placebo-controlled double-blind crossover trial. *Infect. Immun.* 60:4430-4432.
90. Kenner, J.R., Coster, T.S., Taylor, D.N., et al. 1995. Peru 15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* 01. *J. Infect. Dis.* 172:1126-1129.
91. Oberhelman, R.A., Kopecko, D.J., Salazar-Lindo, E., et al. 1991. Prospective study of systemic and mucosal immune responses in dysenteric patients to specific *Shigella* invasion plasmid antigens and lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 59:2341-2350.
92. Phalipon, A., Kaufman, M., P., et al. 1995. Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* 182:769-778.
93. Levine, M.M., Kotloff, K.L., Barry, E.M., et al. 2007. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:540-553.
94. Tacket, C.O. Binion, S.B., Bostwick, E. et al. 1992. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:276-283.
95. Samandari, T., Kotloff, K.L., Losonsky, G.A., et al. Production of IFN-gamma and IL-10 to *Shigella* invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted *Shigella dysenteriae* type 1 strain. *J. Immunol.* 164:2221-2232.
96. Kweon, M.N. 2008. Shigellosis: the current status of vaccine development. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:313-318.
97. Marshall, B.J., Warren, J.R. 1983. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.
98. Parsonnet, J., Hansen, S., Rodríguez, L., et al. 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 330:1267-1271.
99. Cave, D.R., Cutler, A., Goldstein, J., et al. 1996. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Am. J. Med.* 100:12-18.
100. Chen, M., Lee, A., Hazell, S. 1992. Immunization against gastric *Helicobacter pylori* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. *Lancet* 339:1120-1121.
101. Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., et al. 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics the human disease. *Science* 267:1655-1658.
102. Peltala, H., Käyhty, H., Virtanen, M., Mäkelä, P.H. 1984. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* 310:1561-1566.
103. Peltala, H., Käyhty, H., Sivonen, A., Mäkelä, O. 1977. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double blind field study of 100,000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 60:730-737.
104. Eskola, J., Käyhty, Takala, A.K., et al. 1990. A randomized prospective field trial of a conjugated vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N. Engl. J. Med.* 323:1381-1387.
105. Eskola, J., Ölander, R.M., Litmanen, L., et al. 1996. Randomised trial of the effect of co-administration with acellular pertussis DPT vaccine on immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Lancet* 348:1688-1692.
106. Mulholland, K., Hilton, S., Adegbola, R., et al. 1997. Randomised trial of *Haemophilus influenzae* type-b tetanus protein conjugate for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. *Lancet* 349:1191-1197.
107. Musser, J.M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria : molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:496-514.
108. Rosenthal, S.R. 1957. BCG Vaccination against Tuberculosis. Boston, Little, Brown & Co.
109. Rodrigues, L.C., Diwan, V.K., Wheeler, J.G. 1993. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta analysis. *Int. J. Epidemiol.* 22:1154-1158.
110. Brosch, R. Gordon, S.V., Garnier, T., et al. 2007. Genoma plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:5596.
111. Packe, G.E., Innes, J.A. 1988. Protective effect of BCG vaccination in infant Asians: a case-control study. *Arch. Dis. Childhood* 63:277-281.
112. Brandt, L., Feino Cunha, J., Weinreich Olsen, A., et al. 2002. Failure of *Mycobacterium tuberculosis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* 70:672-678.
113. Rook, G.A.W., Dheda, K., Zumia, A. 2005. "Do

- successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting?" *Vaccine* 23:2115-2120.
114. Stechenberg, B. 2008. *Mycobacterium leprae*. En, *The Neurological Manifestations of Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiency Syndromes*. L.L. Barton, N.R. Friedman, eds. Humana Press. pp.257-260.
115. Convit, J., Aranzazu, M., Pinardi, M., Ulrich, M. 1979. Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Clin. Exp. Immunol.* 36:214-220.
116. Zaheer, S.A., Beena, K.R., Kar, H.K. 1995. Addition of immunotherapy with *Mycobacterium w* vaccine to multi-drug therapy benefits multibacillary leprosy patients. *Vaccine* 13:1102-1110.
117. Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., et al. 2000. Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Vaccine* 18:1294-1297.
118. Harrison. 2006. Hepatitis vírica aguda: anatomía patológica. En, *Harrison Principios de Medicina Interna*. 16ª. Ed.
119. Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization. Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 48(RR-12):1-37.
120. Feinstone, S.M., Gust, I.D. 1999. Hepatitis A vaccine. En, *Vaccines*. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, eds., (3rd ed.) Philadelphia: WB Saunders Company. pp. 650-671.
121. Dienstag, J.L. 2008. Hepatitis B virus infection. *New Engl. J. Med.* 359:1486-1500.
122. Buynak, E.B., Roehm, R.R., Tytel, A.A., et al. 1976. Vaccine against human hepatitis B. *JAMA* 235:2832-2834.
123. Hilleman, M.R., McAleer, W.J., Buynak, E.B., McLean, A.A. 1983. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J. Infect. Dis.* 7 suppl. INCOMPLETA
124. Palmer Beasley, R. Development of hepatitis B vaccine. INCOMPLETA
125. Emini, E.A., Ellis, R.W., Miller, W.J., et al. 1986. Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B vaccine. *J. Infection* 13 (sup. A):3-9.
126. Jilg, W., Schmidt, M., Zoulek, G., et al. 1984. Clinical evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine. *Lancet* 1174-1175.
127. Hernán, M.A., Jick, S.S., Olek, M.J., Jick, H. 2004. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis. *Neurology* 63:838-842.
128. Mikaeloff, Y., Caridade, G., Rossier, M., et al. 2007. Hepatitis B vaccination and the risk of childhood-onset multiple sclerosis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161:1214-1215.
129. Simpson, E., Wittet, T., Bonilla, J., et al. 2007. Use of formative research in developing a knowledge translation, approach to rotavirus vaccine introduction in developing countries. *BMC Public Hlth.* 7:281.
130. Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., et al. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565-572.
131. Vesikari, G.T., Karvonen, A., Korhonen, T. et al. 2004. Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine* 22:2836-2842.
132. Ruiz Palacios, G.M., Pérez-Schael, I., Velázquez, R., et al. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354:11-22.
133. Weibel, R.E., Stokes, J., Buynak, E.B., et al. 1968. Jeryl Lynn live attenuated mumps vaccine. *JAMA* 203:14-18.
134. Weibel, R.E., Buynak, E.B., Whitman, J.E. Jr., et al. 1969. Jeryl Lynn strain live mumps virus vaccine. *JAMA* 207:1667-1670.
135. Griffin, D.E., Pan, C.H., Moss, W.J. Measles vaccine. *Front. Biosci.* 13:1352-1370.
136. Griffin, D.E., Pan, C.H. 2009. Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 330:191-212.
137. Hutchison, P.A., Izumi, T., Davidson, G., et al. 1970. Live attenuated rubella vaccine (Cendehill strain) in school children. *Can. Med. Assoc. J.* 103:728-731.
138. Schiff, G.M., Linnemann, C.C., Shea, L., et al. 1974. Evaluation of RA 27/3 rubella vaccine. *J. Pediatr.* 85:379-381.
139. Black, F.L., Lamm, S.H., Emmons, J.E., et al. 1978. Durability of antibody titers induced by RA27/3 rubella virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 137:322-323.
140. Balfour, H.H.Jr., Balfour, C.L., Edelman, C.K., et al. 1976. Evaluation of Wistar RA27/3 rubella virus vaccine in children. *Am. J. Dis. Child.* 130:1089.1091.
141. Dudgeon, J.A., Marshall, W.C., Peckham, C.S. 1969. Rubella vaccine trials in adults and children: comparison of three attenuated vaccines. *Am. J. Dis. Child.* 118:237-246.
142. Best, J.M., Banatvala, J.E., Bowen, J.M. 1974. New Japanese rubella vaccine: comparative trials. *B.M.J.* 3:221-224.
143. Polk, B.F., Medlin, J.F., White, J. A., et al. 1982. A controlled comparison of joint reactions among women

- receiving one of two rubella vaccines. *Am. J. Epidemiol.* 115:19-25.
144. Banatvala, J.E., Brown, D.V. 2004. Rubella. *Lancet* 363:1127-1137.
145. Vesikari, T., Sadzot-Delvaux, C., Rentier, B., Gershon, A. 2007. Increasing coverage and efficiency of measles, mumps, and rubella vaccine and introducing universal varicella vaccination in Europe: a role for the combined vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26:632-638.
146. Harnden, A., Shakespeare, J. 2001. 10-minute consultation: MMR immunisation. *BMJ* 323:32.
147. Schattner, A. 2005. Consequence or coincident? The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. *Vaccine* 23:3876-3886.
148. Fox, A., Lack, G. 2003. Egg allergy and MMR vaccination. *Br. J. Gen. Pract.* 53:801-802.
149. Colville, A., Pugh, S., Miller, E., et al. 1994. Withdrawal of a mumps vaccine. *Eur. J. Pediatr.* 153:467-468.
150. Murch, S.H., Anthony, A., Casson, D.H., et al. 2004. Retraction of an interpretation. *Lancet* 363:750.
151. Klein, N.P., Yin, W.K., Marin, M., et al. 2008. Update: recommendations from the Advisory Committee on immunization practices (ACIP) regarding administration of combination MMRV vaccine. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 57:258-260.
152. World Health Organization, Geneva. 1998. Varicella vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 73:241-248.
153. Holodniy, M. 2006. Prevention of shingles by varicella zoster virus vaccination. *Exp. Rev. Vaccines* 5:431-443.
154. Kimberlin, D.W., Whitley, R.J. 2007. Varicella-zoster vaccine for the prevention of herpes zoster. *New. Engl. J. Med.* 356:1338-1343.25155.
155. Takahashi, M., Otsuka, T., Okuno, Y., et al. 1974. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* 2:1288-1290.
156. Kuter, B., Matthews, H., Shinefield, H., et al. 2004. Ten year follow-up of healthy children who received one or two injections of varicella vaccine. *Pediatr. Infect. Dis.* 23:132-137.
157. Johnson, C.E., Stancin, T., Fattlar, D., et al. 1997. A long-term prospective study of varicella vaccine in healthy children. *Pediatrics* 100:761-766.
158. Asano, Y., Suga, S., Yoshikawa, T., et al. 1994. Experience and reason: Twenty-year follow-up of protective immunity of the Oka strain live varicella vaccine. *Pediatrics* 94:524-526.
159. Arvin, M. 1994. The T lymphocyte response to varicella zoster virus and its relevance to vaccine development. *Rev. Med. Virol.* 4:161-175.
160. Watson, B.M., Keller, B.J., Ellis, R.W., Starr, S.E. 1990. Cell-mediated immunity responses after immunization of healthy seronegative children with varicella vaccine: kinetic and specificity. *J. Infect. Dis.* 162:794-799.
161. Hay, A.J., Gregory, V., Douglas, A.r., Lin, Y.P. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356:1861-1870.
162. Lynch, J.P., Walsh, E.E. 2007. Influenza: evolving strategies in treatment and prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 28:144-158.
163. Wang, Z., Tobler, S., Roayael, J., Eick, A. 2009. Live attenuated or inactivated influenza vaccines and medical encounters for respiratory illnesses among US military personnel. *JAMA* 301:945-953.