

# Fundamentos y avances de la vacunación con ADN

*Raúl Garza-Velasco,<sup>1</sup> Janet Gallardo-Celis<sup>1</sup> y Luis Manuel Perea-Mejía<sup>2</sup>*

## Abstract (*Foundations and advances of DNA vaccination*)

DNA vaccines represent a promissory strategy to protect people from contagious diseases because of its probed potential to induce an effective stimulation of the immune system against the antigen. The best vectors of DNA vaccines are bacterial or synthetic plasmids that contain genes to produce the required immunogenic molecule and other complementary compounds.

Efficiency of DNA vaccination is determined by the fact that inoculated people synthesize microbial substances associated with invasiveness and toxigenicity of the etiological agent. Consequently, immunity is developed on time and it neutralizes late natural infections, toxin-infections and intoxications.

Scientific community works hardly to reproduce in people and without secondary effects the excellent results obtained in animal models. It implicates that commercialization of this kind of products is not a short time goal.

## Introducción

La sorprendente evolución de los agentes patógenos que afectan al humano se ve reflejada esencialmente en el desarrollo y perfeccionamiento de los diversos mecanismos a través de los cuales aquéllos evaden parcialmente al sistema inmune de su hospedero.

En consecuencia, el diseño de mejores vacunas requiere de la aplicación de nuevas herramientas científicas, no sólo porque la mayoría de los métodos tradicionales han venido resultando prácticamente inútiles desde hace varias décadas sino, principalmente, debido al inconveniente desequilibrio que se ha generado entre la adecuada producción de nuevos agentes terapéuticos y los muy pobres avances en cuanto a la prevención de las enfermedades infecciosas.

En tal contexto, la vacunación con ADN representa una prometedora estrategia para tratar de neutralizar o prevenir numerosos padecimientos asociados a microorganismos especialmente virulentos, incluidos diversos parásitos intracelulares estrictos y facultativos cuya capacidad para residir dentro de las células del hospedero sustenta su resistencia durante mayores lapsos a los mecanismos de defensa de los individuos afectados.

El presente trabajo pretende aportar un panorama general de las características más relevantes de las vacunas de ADN y de los avances que se han logrado hasta ahora, ya que incuestionablemente aquéllas significan una novedosa opción para contender en el futuro con las afecciones más relevantes de corte bacteriano, viral y parasitario.

## Principales características de una vacuna ideal

El papel central de una vacuna consiste en preparar al sistema inmune, a fin de que su respuesta resulte vasta y oportuna cuando el individuo sea invadido por el agente patógeno correspondiente o sus respectivas toxinas. Desde el punto de vista inmunológico, una vacuna ideal es aquella que imita a la infección y/o a la intoxicación natural, desencadenando una respuesta inmune específica, eficiente, humoral y celular, así como de muy largo plazo, sin la necesidad de acompañarla con adyuvantes o de administrar refuerzos (Moreno, 2004).

Adicionalmente, debe involucrar procedimientos sencillos para la obtención y preparación del antígeno, tales como los cultivos en el laboratorio, la síntesis química o la biología molecular pero, al margen de ello, el antígeno en turno debe funcionar como buen inmunógeno e inducir una respuesta inmune de memoria, dependiente de los linfocitos T. Ello implica que los antígenos se dividen en los que generan respuestas dependientes de los linfocitos T (TD) e independientes de los linfocitos T (TI) (Lesinski, 2001).

Los antígenos TD son, en su mayoría, proteínas que inducen la formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B (previa interacción de éstos con los linfocitos T), dando lugar a una respuesta inmune duradera, tanto humoral como celular; comúnmente

<sup>1</sup> Facultad de Química, UNAM.

Correo electrónico: raugarza@servidor.unam.mx

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, UNAM.

Recibido: 2 de agosto de 2006; aceptado: 4 de enero de 2007.

**Tabla 1.** Principales factores presentes en una vacuna exitosa (Arnon, 2003).

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

fungen como excelentes inmunógenos –aun en menores de dos años– y dejan una buena memoria inmunológica. Por su parte, los antígenos TI suelen corresponder a moléculas de pequeño o mediano peso molecular y con subunidades repetitivas, las cuales no originan una respuesta inmune con memoria, ni requieren de los linfocitos T cooperadores para estimular la respuesta inmune; frecuentemente se trata de polisacáridos y lipopolisacáridos, que resultan inmunógenos débiles en menores de dos años y sólo se transforman en TD al conjugarse con proteínas acarreadoras (Lesinski, 2001).

Evidentemente, los esquemas de vacunación contemplan la posibilidad de aportar suficiente cantidad de antígeno al sistema inmune, para que se genere una cantidad vasta de linfocitos T y B, si bien se pretende que también provean una importante protección temprana, aunque el sistema inmune de los infantes implicados no haya madurado completamente (Gordon, 2001).

Por último, las vacunas deben ser estables y seguras, no requerir de refrigeración para su almacenamiento ni durante su traslado, presentar efectos adversos mínimos, desencadenar una vasta respuesta con dosis mínimas del antígeno, ser económicas, de administración sencilla y, preferentemente, polivalentes (immunizar contra diversos microorganismos) (Arnon, 2003).

### Vacunas clásicas y de subunidades

Las vacunas se pueden clasificar con base en las características de los inmunógenos que las conforman y, en general, el término vacunas “clásicas” o “convencionales” incluye a las constituidas por microorganismos inactivados (muertos) o vivos atenuados, pero no a las confeccionadas por subunidades provenientes de las estructuras microbianas ni a las

fabricadas mediante ingeniería genética, las últimas de las cuales son conocidas como “vacunas de la tercera generación” (Arnon, 2003; Hasan, 1999).

*Vacunas constituidas por microorganismos vivos atenuados.* Estas inducen inmunidad imitando al proceso infeccioso; de hecho, el microorganismo se reproduce naturalmente, presentando sus antígenos en la forma original, lo que por lo regular propicia una vasta respuesta inmune humoral y celular, sin que ocurra la enfermedad (Arnon, 2003; Mäkelä, 2000).

La atenuación corresponde a la eliminación parcial o total de los factores microbianos que provocan la afección y anteriormente se lograba cultivando al agente bajo condiciones adversas, subcultivándolo repetidamente o exponiéndolo a la acción de sustancias mutagénicas; sin embargo, esta clase de métodos implica un riesgo potencial de que la mutación se revierta y reduzca la seguridad de la vacuna (Cho, 2003).

Desde el punto de vista inmunológico, este tipo de productos se consideran muy efectivos, debido a que desencadenan una inmunidad intensa y duradera, tanto humoral como celular, sin la necesidad de incorporar adyuvantes ni aplicar refuerzos. Sus desventajas incluyen el hecho de que el microorganismo debe ser cultivado en el laboratorio, lo que involucra la posibilidad de que afecte al personal y/o de que se contamine con agentes virales, aunque también influyen los costos de su almacenamiento y conservación, ya que las vacunas resultantes se deben mantener a 4°C para evitar que pierdan viabilidad y eficacia. Lógicamente, las dificultades asociadas al control de la atenuación dejará de representar un problema con la caracterización genética del agente y la detección de los genes que codifican para sus factores de virulencia, ya que ello permitirá inducir mutaciones múltiples o eliminaciones puntuales que anulen cualquier posibilidad de que se revierta la patogenicidad (Mäkelä, 2000).

*Vacunas de microorganismos inactivados (muertos).* En este tipo de vacunas se utiliza al microorganismo completo y el proceso de inactivación suele realizarse mediante tratamientos físicos o químicos que no alteran la inmunogenicidad de las determinantes antigénicas correspondientes (Cho, 2003; Mäkelä, 2000).

El problema de estos productos radica principalmente en su limitada eficacia, ya que la inmunidad generada sólo es humoral, resulta menos intensa y duradera, e inclusive, se requieren grandes cantidades del antígeno para lograr la estimulación del

sistema inmunológico, lo que impacta negativamente en el aspecto económico. Adicionalmente, ese incremento de la dosis antigénica puede ocasionar efectos adversos relacionados con las endotoxinas de las bacterias Gram negativas.

Las únicas vacunas de esta clase que permanecen vigentes son las de la tifoidea y la tosferina; no obstante, una futura vacuna contra la polio, compuesta por una mezcla de virus atenuados (más efectivos pero menos seguros) e inactivados (menos efectivos pero plenamente seguros), representa un proyecto muy interesante a concretarse en el corto plazo (Gordon, 2001).

*Vacunas de subunidades.* Los parásitos, virus y bacterias suelen presentar varias sustancias de superficie que no participan en la respuesta inmune, e inclusive, se han detectado algunas que podrían suprimir dicha respuesta y otras que eventualmente ocasionarían problemas de hipersensibilidad al ser administradas como parte de una vacuna (Arnon, 2003).

Por tales motivos, durante los años 70 y los 80 se introdujeron vacunas constituidas únicamente por proteínas purificadas o polisacáridos capsulares, a las que se denominó “vacunas de subunidades” por estar conformadas con una parte definida de los microorganismos o de las sustancias excretadas por ellos (Cho, 2003).

Las vacunas de subunidades incluyen polisacáridos, proteínas o péptidos, los cuales frecuentemente se elaboran mediante la tecnología del ADN recombinante o por síntesis química. En este sentido, su desventaja ya no reside en la desviación de la respuesta inmune hacia numerosos “blancos”, sino en su carencia de complejidad estructural, la cual se traduce en una menor inmunogenicidad; ello es particularmente cierto para el caso de la cápsula bacteriana, uno de los factores de virulencia más importantes, la cual está compuesta por unidades químicas polimerizadas –las cuales difieren en cada especie– cuyos monómeros son una combinación de monosacáridos, grupos fosfato y pequeñas moléculas orgánicas (Arnon, 2003; Cho, 2003).

En otras palabras, las vacunas “capsulares” contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), 5 serotipos de meningococos y más de 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*, han resultado un verdadero éxito, pero también es claro que son sólo parcialmente efectivas en niños menores de dos años y que no inducen la activación de los linfocitos B de memoria (Robinson, 2002).

La originalmente baja inmunogenicidad de los

polisacáridos se ha superado uniéndolos a proteínas transportadoras –mediante enlaces covalentes–, lo cual ha generado las denominadas “vacunas conjugadas”, que promueven una inmunidad celular con linfocitos T de memoria, así como una respuesta humoral vasta y persistente (Lesinski, 2001; Robinson, 2002).

Ciertamente, el constante progreso en el campo de los antibióticos ha obstaculizado el desarrollo de este tipo de vacunas, pero las continuas fallas terapéuticas y el surgimiento y proliferación de cepas resistentes han vuelto a interesar a los investigadores en su importante papel profiláctico.

Las técnicas del ADN recombinante, la clonación y la secuenciación han permitido determinar el orden exacto de los aminoácidos en diferentes antígenos, al grado de que ya se están sintetizando péptidos que funcionan como vacunas, los cuales ofrecen grandes ventajas en términos de pureza, costo, almacenamiento, estabilidad y alta especificidad, al margen de que también resultan muy efectivos en cuanto a la etapa de su presentación vía las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las clases I y II (Robinson, 2002).

Las vías de administración que han resultado efectivas para aplicar esta clase de vacunas son la intranasal, oral e intradérmica; las perspectivas para su manufactura son muy amplias y varias podrían pasar del campo experimental al farmacéutico, pues la producción de péptidos sintéticos resulta mucho más factible que la realización de cultivos a gran escala.

*Vacunas con toxinas inactivadas (toxoides).* Las toxinas bacterianas son responsables de enfermedades tales como cólera, tosferina y ántrax; su purificación e inactivación química o genética ha llegado a originar vacunas altamente efectivas, destacando los toxoides antitetánico y antidiftérico, cuya aplicación origina anticuerpos que neutralizan a las exotoxinas respectivas, mediante el bloqueo y/o modificación de sus sitios activos (Scarselli, 2005).

En el caso del colerígeno, su fracción B no es tóxica y se produce por ingeniería genética para aplicarla como parte de una nueva vacuna, la cual pretende interferir la unión de la toxina a sus células “blanco” en la mucosa intestinal. Por su parte, el ántrax no es una enfermedad relevante en humanos, pero el temor a una guerra biológica o a ataques bioterroristas ha mantenido el interés por desarrollar alguna vacuna; el antígeno protector es una parte de la toxina y su administración confiere protección contra el padecimiento (Scarselli, 2005).

### Vacunología inversa

La posibilidad de determinar la secuencia genómica de los agentes causales y los notables avances de la inmunología y la bioinformática han revolucionado enormemente el campo de la vacunología. Actualmente, se pueden identificar numerosos antígenos potenciales para el desarrollo de vacunas, sin la necesidad de cultivar en el laboratorio al agente causal; a la metodología implicada se le conoce como “vacunología inversa” y se espera que constantemente estará redituando diversas informaciones de calidad, tomando en consideración que hasta el momento se cuenta con alrededor de 172 secuencias genómicas completas de microorganismos patógenos y que más de 400 se encuentran en vías de ser reveladas. Es decir, en breve podrán analizarse proteínas microbianas significativas, comparar las secuencias genómicas entre bacterias patógenas y comensales y, desde luego, identificar los genes relacionados con diversas enfermedades, para trabajar en su secuencial purificación y manipulación (Scarselli, 2005).

### Bases fundamentales de la vacunación con ADN

Hasta hace algún tiempo, se pensaba que la inoculación de ADN exógeno al interior de una célula hospedera implicaría la hidrólisis inmediata de dicha molécula por parte de las ADNasas celulares. Sin embargo, interesantes investigaciones establecieron lo contrario, previa inyección de plásmidos<sup>1</sup> de ADN por vía intramuscular a diversos lotes de ratones (Huygen, 2005).

Los plásmidos administrados a dichos animales contenían genes informadores<sup>2</sup> que codificaban para enzimas tales como cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa y beta-galactosidasa ( $\beta$ -gal) y, para proteger al ADN de la degradación enzimática, una parte de las moléculas involucradas se encontraba recubierta por lípidos catiónicos. En concreto, los plásmidos recubiertos se administraron al presunto “lote problema” y, los desnudos, a un supuesto “lote control”, esperando que la expresión de los genes resultaría mayor en el primero; no obstante, ello no

ocurrió como se preveía, sentando un precedente muy útil para el campo de la vacunación con ADN (Huygen, 2005).

Las vacunas de ADN, también denominadas vacunas génicas, polinucleotídicas o de ácidos nucleicos, están conformadas precisamente por plásmidos de ADN (pADN) que contienen al gen o genes de interés previamente localizados mediante *vacunología inversa*. Evidentemente, la inmunización con ácidos nucleicos incluye la posibilidad de administrar ADN o ARNm pero, en realidad, las vacunas conformadas por este último tienen una aplicación limitada, habida cuenta que su vida media es especialmente corta, aspecto que determina una baja efectividad en cuanto a la inducción de la respuesta inmune (Hasan, 1999).

En contraparte, varios estudios realizados en modelos animales han demostrado ampliamente la eficacia de las vacunas de ADN desnudo aunque, por razones aún desconocidas, esos promisorios resultados no se han podido reproducir en seres humanos. De hecho, éste representa uno de los tópicos de mayor importancia para los grupos que estudian las vacunas de ADN, los cuales intentan superar las limitaciones de éstas en humanos, a través de la optimización de los sistemas de liberación, la variación de las vías de administración, la potenciación de la expresión del antígeno implicado, el establecimiento de los mejores esquemas de inmunización y el empleo de adyuvantes apropiados.

Una vez que el producto es inoculado se requiere que ocurra la transfección hacia los diferentes tipos de células del hospedero y que el ADN exógeno alcance secuencialmente el citoplasma y el núcleo “blanco”, en donde tiene lugar la transcripción correspondiente bajo la influencia de la ARN polimerasa II y de otras diversas proteínas accesorias del hospedero; por último, el ARNm es traducido para dar lugar a la proteína en turno (Garmory, 2005).

Finalmente, el manejo del inmunógeno por parte del hospedero tiene que ver con estos tres mecanismos (Garmory, 2003, Garmory, 2005; Kirman, 2003):

- a. *Presentación antigénica a los linfocitos T por parte de las células presentadoras de antígeno<sup>3</sup> (APCs)*. Cuando las células dendríticas (DCs), los macrófagos o los linfocitos B son transfectados directamente,

<sup>1</sup> Los plásmidos son moléculas de ADN circular de doble cadena, extracromosómicos y de replicación autónoma.

<sup>2</sup> Los genes informadores (del inglés *reporter genes*) codifican para proteínas con actividad enzimática conocida, lo que permite detectar su expresión en las muestras analizadas.

<sup>3</sup> Las células presentadoras de antígeno (APCs) son los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas.

producen el antígeno, lo procesan y lo presentan a linfocitos T, vía su MHC-I o MHC-II.

- b. *Presentación cruzada.* Las células somáticas transfectadas sintetizan y secretan la proteína antigénica, la cual es fagocitada por APCs para dar lugar a la respuesta inmune.
- c. *Reconocimiento antigénico por los CTLs<sup>4</sup> en células somáticas.* El proceso supone que miocitos, queratinocitos y células epiteliales producen el inmunógeno y, posteriormente, procesan una parte de él y lo presentan a los linfocitos T CD8+, vía su MHC-1; de esta manera, ocurre la lisis de dichas células somáticas y, por ende, la liberación del resto del antígeno, para su captación por las APCs migratorias.

La vacunación con ADN podrá erigirse como la mejor opción preventiva, ya que desencadena una respuesta inmune humoral y una inmunidad mediada por células, con participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; además, no implica los riesgos de reversión de la patogenicidad que caracterizan a las vacunas atenuadas y podría representar la mejor terapia contra varias enfermedades debilitantes cuya neutralización continúa siendo complicada (Hasan, 2001).

### Componentes esenciales de las vacunas de ADN

Por lo general, las vacunas de ADN contienen un plásmido que constituye el vehículo transportador del gen que codifica para la proteína inmunogénica; dicho plásmido proviene de alguna bacteria preferentemente inocua (por lo regular de la especie *Escherichia coli*), o bien, es el producto de técnicas de ingeniería genética, en cuyo caso suele contener genes modificados artificialmente que incrementan la eficacia vacunal (Huygen, 2005; Prather, 2003).

De hecho, la mayoría de las moléculas plasmídicas bajo observación incluye los elementos necesarios para propiciar y potenciar la expresión génica dentro de las células “blanco”. Sus componentes más relevantes, son (Huygen, 2005):

1. *El promotor eucariótico.* Éste corresponde al sitio de unión para la ARN polimerasa II y, por lo tanto, de él depende que inicie la transcripción en las células de mamíferos. En general, los más

utilizados son de origen viral, como el del citomegalovirus humano (HCMV), ya que origina altos niveles de expresión génica, favoreciendo una vasta respuesta humoral; no obstante, su actividad puede disminuir en ambientes con altos niveles de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , lo que supone un problema, ya que diversas afecciones cursan con elevadas proporciones de estas citocinas inflamatorias. Otros promotores bajo análisis son los de los virus SV40 (*simian virus 40*) y RSV (*Rous sarcoma virus*) (Garmory, 2003; Prather, 2003).

2. *Las secuencias de ADN que codifican para la síntesis del antígeno de interés.* Representan la fracción más importante de nucleótidos, ya que su expresión constituye un requisito indispensable para la prevención de los padecimientos. Son insertadas en el denominado “sitio de clonación”, localizado generalmente corriente arriba del promotor. Cabe señalar que, en relación con algunos padecimientos, la expresión de un solo gen no resultaría suficiente para proteger al hospedero, por lo que es preciso incorporar otros segmentos de ADN cuyos productos amplíen y hagan eficiente la respuesta inmunológica (Moreno, 2004).

La elaboración de vacunas de ADN multivalentes implica la conjunción de varios plásmidos que codifiquen para antígenos de uno o más patógenos, o bien, la promoción de la expresión múltiple por un solo plásmido que propicie la síntesis de todos los antígenos deseados, lo que requeriría la inserción de varias unidades transcripcionales con su respectivo promotor (Lowrie, 2005).

El diseño de vacunas de ADN multivalentes resulta de gran interés para la protección contra malaria, SIDA y tuberculosis, en virtud de que la expresión de un solo antígeno de sus respectivos agentes etiológicos no se traduciría en una inmunización eficaz. La primera vacuna multivalente de ADN se desarrolló con antígenos de los virus de la influenza, herpes simplex y respiratorio sincicial; se cree que ésta aportará buenos resultados, ya que ha protegido a los animales inoculados contra los tres patógenos involucrados (De Magistris, 2006; Rolland, 2005).

3. *Las secuencias inmunoestimuladoras (motivos CpG).* Se ubican en los plásmidos de ADN bacteriano, asumiendo la forma de hexámeros palindrómicos denominados oligodesoxinucleótidos

<sup>4</sup> Linfocitos T citotóxicos.

(ODN); a su vez, éstos contienen dinucleótidos no metilados conocidos como motivos CpG (citosina-fosfato-guanina), los cuales están flanqueados por dos purinas en la posición 5' y dos pirimidinas en la posición 3'. A este respecto, se ha observado que las purinas GA en la posición 5', las pirimidinas TC o TT en la posición 3' y el hexámero 5'-TGACGTT-3' son las secuencias que propician una mayor inmunoestimulación, si bien las más frecuentes son la GACGTT –en ratones– y la GTCGTT –en el humano– (Lowrie, 2005; Mutwiri, 2004).

Los motivos CpG están altamente conservados en bacterias y el sistema inmune de los organismos eucarióticos ha evolucionado para reconocerlos, tal como si se tratara de señales de peligro. De hecho, se ha demostrado que las vacunas de ADN no cubren las expectativas cuando carecen de ellos y que, inclusive, al insertarse moléculas adicionales de CpGs al plásmido, se desencadena una más intensa respuesta humoral y celular (Kirman, 2003; Mutwiri, 2004).

Los motivos CpG del ADN bacteriano son “ligandos” reconocidos como “patrones moleculares asociados a patógenos” por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del tipo Toll-9 (TLR-9), localizados en la superficie de diversas células del sistema inmune; ello resulta muy interesante, ya que los PRRs son trascendentales en distintos aspectos: a) para el mantenimiento de la memoria inmunológica; b) para la proliferación, activación y maduración de las DCs, los monocitos y los macrófagos; c) para la síntesis de IL-1, IL-6 e IL-10 (interleucinas que promueven una respuesta inmune sostenida), y d) para la expresión de moléculas MHC-II sobre las APCs y de las proteínas coestimuladoras CD40, B7-1, B7-2 e ICAM-1 (Garmory, 2005; Huygen, 2005; Mutwiri, 2004).

4. *Otros componentes.* A los tres elementos fundamentales descritos anteriormente se suman otros que también desempeñan funciones relevantes antes o después de la vacunación; entre ellos se cuentan los siguientes (Bivas, 2005; Garmory, 2005):

Secuencias finalizadoras de la transcripción, que garantizan que el ARNm sea terminado apropiadamente y aportan estabilidad a los transcritos de ARN; destacan entre ellas las secuencias de poli A derivadas del virus SV40.

Marcadores de selección: genes de resistencia a

antibióticos, los cuales facilitan la selección de las colonias bacterianas que proporcionan el plásmido.

El origen bacteriano de replicación, un segmento útil para que el plásmido se pueda replicar masivamente en sistemas bacterianos; a tal respecto, suele elegirse al ColeE1 –encontrado en los plásmidos pUC de *Escherichia coli*.

### Vías de administración y sistemas de liberación

La biodistribución de las vacunas de ADN en el organismo constituye un elemento particularmente relevante que depende de diferentes factores, incluyendo la vía de administración, la formulación, los sistemas de liberación y las propiedades fisicoquímicas del plásmido implicado (Rolland, 2005).

En cuanto a las vías de administración, se han estudiado varias de ellas, tales como la intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intranasal (i.n.), oral, vaginal, si bien se ha coincidido que las dos primeras resultan las más efectivas.

Por otra parte, la eficacia de las vacunas de ADN no se ha podido reproducir en seres humanos, debido aparentemente a su limitada distribución en los diversos tejidos y a que una parte importante de los plásmidos son degradados por los macrófagos, antes de que aquéllos alcancen el núcleo “blanco” de estas células fagocitarias (Garmory, 2003; Huygen, 2005).

Los sistemas de liberación en estudio buscan optimizar la liberación plasmídica en el organismo hospedero, incrementando la supervivencia del ADN exógeno y su captación por parte de las células “blanco”. Destacan los clasificados como mecánicos (inyecciones con agujas o presión y el bombardeo de partículas), eléctricos (electroporación), químicos (que involucran a los liposomas o cualquier encapsulación del ADN con diversos polímeros) y acarreadores biológicos (bacterianos o virales) (Garmory, 2005).

### Aplicaciones

Aún cuando la finalidad primaria de las vacunas radica en la prevención de enfermedades infecciosas graves y/o frecuentes, la vacunación con ADN ha adicionado la posibilidad de desempeñar funciones terapéuticas que combatan a otras clases de padecimientos. En tal contexto, el elemento más relevante del producto es precisamente el gen que codifica para la síntesis de la proteína de interés, ya sea que

ésta sea destinada a la estimulación del sistema inmunológico del individuo, o bien, a corregir alguna disfunción en el organismo hospedero.

Entre los numerosos agentes causales contra los cuales se busca que funcione esta clase de productos destacan los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), herpes simplex (HSV), herpes bovino (BHV), citomegalovirus (CMV), ébola, hepatitis B (HBV), hepatitis C, influenza (flu), sarampión, rabia y rotavirus; las bacterias *Mycoplasma pulmonis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Salmonella sp*, *Rickettsia*, *Yersinia enterocolytica* y *Listeria monocytogenes*; los parásitos *Leishmania major*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma japonicum*, y otros agentes tales como la toxina tetánica, y diversas alergias y cánceres (Bivas, 2005; Garmory, 2005; Kirman, 2003; Lowrie, 2005).

### Comentarios finales

Los plásmidos que constituyen a las vacunas de ADN resultan trascendentales: sólo los menores de 15 kilobases se asocian a elevados índices de transformación en las poblaciones bacterianas empleadas para su multiplicación y a tasas convenientes de transfección en las células “blanco” de los individuos vacunados. Por esta razón y porque pueden constituirse como sistemas multivalentes contra uno o varios patógenos, todos los vectores plasmídicos terminarán siendo sintetizados por ingeniería genética.

Las vacunas de ADN parecen ofrecer numerosas ventajas en comparación con las de cualquiera otra índole; sin embargo, es indispensable comprobar plenamente que la administración del ADN exógeno es relativamente inofensivo: por ejemplo: a) que no se inserta en el genoma del hospedero, ya que de lo contrario podría activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores —actualmente se estima que dicha inserción ocurre sólo una vez por cada millón de células transfectadas—; b) que no originaría defectos genéticos heredables por integrarse a las células germinales; y c) que realmente no desencadenaría la producción de anticuerpos anti-ADN responsables de provocar o acelerar el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

El principal competidor de las vacunas también reside en la propia industria farmacéutica: los antibióticos, en virtud de que representan para las empresas productoras una opción más interesante des-

de el punto de vista económico, a pesar del serio riesgo para la salud pública que significa la propagación de la multiresistencia bacteriana. ■

### Referencias

- Arnon R. and Ben-Yedidia T.: Old and New Vaccine Approaches, *International Immunopharmacology*, 2003; 3: 1195-1204.
- Bivas B.M., Ottenhoff H.T., Junginger E.H and Borchard G.: Pulmonary DNA Vaccination: Concepts, Possibilities and Perspectives, *Journal of Controlled Release*, 2005; 20: 1-29.
- Cho W.M.: Subunit Protein Vaccines: Theoretical and Practical Considerations for HIV-1, *Current Molecular Medicine*, 2003; 3: 243-263.
- De Magistris M.: Mucosal Delivery of Vaccine Antigens and its Advantages in Pediatrics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006; 20: 1-16.
- Garmory S.G., Brown A.K. and Titball W.R.: DNA Vaccines: improving Expression of Antigens, *Genetic Vaccines and Therapy*, 2003; 1(2): 1-5.
- Garmory S.G., Perkins D.S., Philpot J.R. and Titball W.R.: DNA Vaccines for Biodefense, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005; 57: 1343-1361.
- Gordon A.: Vaccines and Vaccination, *The New England Journal of Medicine*, 2001; 345(14): 1042-1054.
- Hasan A.U., Abai M.A., Harper R.D., Wren W.B. and Morrow W.J.: Nucleic Acid Immunization: Concepts and Techniques Associated with Third Generation Vaccines, *Journal of Immunological Methods*, 1999; 229: 1-22.
- Huygen K.: Plasmid DNA Vaccination, *Microbes and Infection*, 2005; 7: 932-938.
- Kirman R.J. and Seder A.R.: DNA Vaccination: the Answer to Stable, Protective T-cell Memory?, *Current Opinion in Immunology*, 2003; 15: 471-476.
- Lesinski B.G. and Westerink A.M.: Novel Vaccine Strategies to T-independent Antigens, *Journal of Microbiological Methods*, 2001; 47: 135-149.
- Lowrie B.D.: DNA Vaccines for Therapy of Tuberculosis: Where Are We Now?, *Vaccines*, 2005; 30: 1-7.
- Mäkelä P.H.: Vaccines, Coming of Age After 200 Years, *FEMS Microbiology Reviews*, 2000; 24: 9-20.
- Moreno S. and Timon M.: DNA Vaccination: An Immunological Perspective, *Immunology*, 2004; 23(1): 41-55.
- Mutwiri K.G., Nichani K.A., Babiuk S. and Babiuk A.L.: Strategies for Enhancing the Immunostimulatory Effects of CpG Oligodeoxynucleotides, *Journal of Controlled Release*, 2004; 97: 1-17.
- Prather J.K., Sagar S., Murphy J. and Chartrain M.: Industrial Scale Production of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy: Plasmid Design, Production, and Purification, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003; 33: 865-883.
- Robinson H.W., Garren H., Utz J.P. and Steinman L.: Proteomics for the Development of DNA Titering Vaccines to Treat Autoimmune Disease, *Clinical Immunology*, 2002; 103(1): 7-12.
- Rolland A.: Gene Medicines: The End of the Beginning?, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005; 57: 669-673.
- Scarselli M., Giuliani M., Adu-Bobie J., Pizza M. and Rappuoli R.: The Impact of Genomics on Vaccine Design, *Trends in Biotechnology*, 2005; 23(2): 84-92.