

Ana Rosa Aguilera Juárez, Carlos Eliud Angulo Valadez y Luis Hernández Adame

Nanovacunas que valen oro

Las vacunas han salvado miles de millones de vidas al emplearse como tratamiento preventivo contra enfermedades infecciosas. La nanovacunología es un enfoque novedoso para el uso de nanopartículas como vehículos de entrega de vacunas. En este artículo se describe y propone, a partir de un método sencillo de síntesis, un prototipo de nanovacu- na basada en nanopartículas de oro contra infecciones gastrointestinales.

La vacunación es el método más económico y efectivo para disminuir la mortalidad provocada por enfermedades infecciosas en todo el mundo. Actualmente se cuenta con 26 vacunas destinadas a la prevención de afecciones como la varicela, rabia, tétanos, influenza y virus del papiloma humano (VPH), además de que recientemente se desarrollaron diversas plataformas de vacunas contra COVID-19. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2018 cerca de 19.4 millones de personas no recibieron ningún tipo de vacunación. Por tal motivo, es necesario buscar alternativas innovadoras que permitan que las vacunas lleguen al mayor número de personas; para ello, debe procurarse que no pierdan su seguridad y eficacia y que sean económicamente viables para asegurar que los sectores más vulnerables de la población tengan acceso a ellas. A continuación se describe una opción de síntesis de prototipos de vacunas mediante nanotecnología como una herramienta para la fabricación de nanovacunas basadas en un material poco convencional para la medicina moderna hasta hace unos años: el oro.

Nacimiento de la vacunación

La “variolización” es la primera forma conocida de vacunación que se remonta a la antigua China en el siglo XI. No obstante, fue hasta 1721 en Gran Bretaña cuando Lady Mary Wortley Montagu formalizó la técnica, que consistía en inocular el pus obtenido de las pústulas de personas enfermas de “variola” a personas sanas. De esta manera se logró hacer inmunes a las personas contra el virus de la



hoy conocida viruela. Posteriormente, en 1796, Edward Jenner creó la primera vacuna contra esta enfermedad; administró a un niño la linfa (costra) de viruela vacuna, es decir, viruela de las vacas (de ahí el nombre con que conocemos hoy día a este método de prevención).

En 1885 Louis Pasteur desarrolló la vacuna contra la rabia que mostró su efectividad en el niño Joseph Meister a partir de la administración diaria, durante dos semanas, de fluidos y tejidos emulsificados obtenidos de cerebros de conejos que habían muerto por esta enfermedad. Además de salvarlo de la inminente muerte, Pasteur demostró que se podían obtener defensas específicas contra una infección si se administran formas debilitadas o atenuadas del microorganismo patógeno.

Así, la vacunación se ha revolucionado con el paso del tiempo (véase la Figura 1). La variolización fue remplazada por la administración de microorganismos atenuados, que hoy día se ha sustituido por el uso de formulaciones con subunidades (componentes: proteínas) de agentes infecciosos, e incluso con su material genético. Las vacunas de segunda y tercera generación (véase la Figura 2) se distin-

guen porque, además de que han permitido mantener el equilibrio entre eficacia y seguridad, utilizan ciencias innovadoras como la nanotecnología para mejorar su formulación, como es el caso de las nanovacunas.

Nanopartículas y su clasificación

La nanotecnología es la ciencia encargada del estudio de la materia a escala nanométrica. Los nanómetros (nm) son las unidades de medida de las nanopartículas. Para darnos una idea de este tamaño, hay que considerar que en un metro (m) hay un millardo (mil millones) de nanómetros. Una partícula es considerada nanopartícula cuando mide menos de 100 nm. El tamaño de las nanopartículas es un parámetro fundamental para considerar en su empleo biológico; por lo general se usan nanopartículas de 10 a 100 nm de diámetro, aunque son muchos los criterios por considerar al momento de elegir el tamaño y la forma de la nanopartícula, según el uso al cual estarán destinadas.

Las nanopartículas se clasifican por su composición química en dos grupos principales: orgánicas e



- **1721** Introducción de la “variolización” de Asia a Europa.
- **1796** Primera vacuna exitosa: **viruela**.
- **1885** Primera vacuna vía-atenuada contra la **rabia**.
- **1886** Vacunas de organismos muertos: cólera, tifoidea.
- **1900** Vacunas de toxoides: difteria y tétanos.
- **1948** Primera vacuna combinada: difteria, tétanos y tos ferina.
- **1950** *In vitro* cultivo celular: salk y Sabin, vacunas contra la polio.
- **1970** Primera vacuna de polisacáridos. Meningococcus, Neumococcus.
- **1980** Vacunas de glicoconjugados: vacuna de la Hepatitis B (HBV).
- **1981** Primera vacuna recombinante: vacunas de antígenos HBV.
- **2010** Vacunas terapéuticas para cáncer de próstata.
- **2013** Vacunología reversa: Meningococcus B.

Figura 1. Fechas sobresalientes de la historia de la vacunación. Fuente: Delany y cols. (2014).

inorgánicas. Entre las primeras podemos encontrar a todas aquellas compuestas por carbono (C); por ejemplo, los liposomas (grasas), las micelas (como las que se forman con las sales biliares en nuestro hígado y se almacenan en la vesícula biliar) o el quitosano (compuesto presente en exoesqueletos de crustáceos y microorganismos). Por otra parte, en la clasificación de las nanopartículas inorgánicas encontramos a las nanopartículas conductoras y semiconductoras.

Las nanopartículas de metales como el oro (Au) y la plata (Ag) son ejemplo de nanopartículas conductoras; las nanopartículas de óxidos de elementos como el cinc (Zn) son un ejemplo de nanopartículas semiconductoras. La naturaleza química de las nanopartículas es un criterio esencial para su selección, ya que este parámetro permite predecir el comportamiento que tendrán al ser administradas o puestas en contacto con los sistemas biológicos.

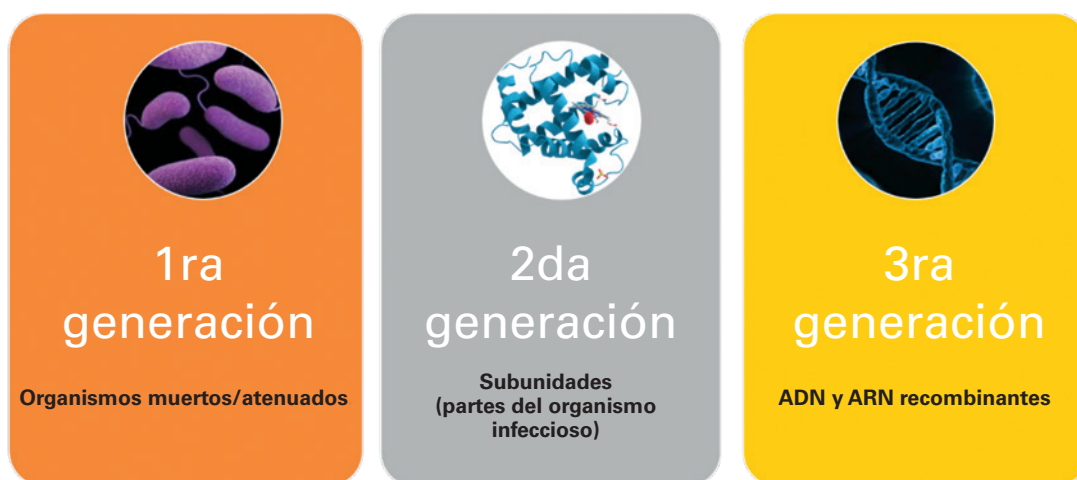


Figura 2. Tres generaciones de vacunas. Fuente: Delany y cols. (2014).

Empleo de nanopartículas en la medicina

 Hoy las nanopartículas tienen un uso muy extendido en beneficio de la salud por sus diversas propiedades fisicoquímicas determinadas por su naturaleza química. En la última década se ha investigado y demostrado que las nanopartículas metálicas poseen propiedades fototerapéuticas aprovechables para el tratamiento del cáncer; a la fecha continúan en investigación para su posible uso en humanos. También se ha comprobado que las nanopartículas metálicas, específicamente de plata, tienen efectos antimicrobianos, y tanto las nanopartículas orgánicas como las inorgánicas se han empleado para los mecanismos de liberación y transporte de fármacos (Jeevanandam y cols., 2018; Kim y cols., 2014; Salazar y cols., 2015).

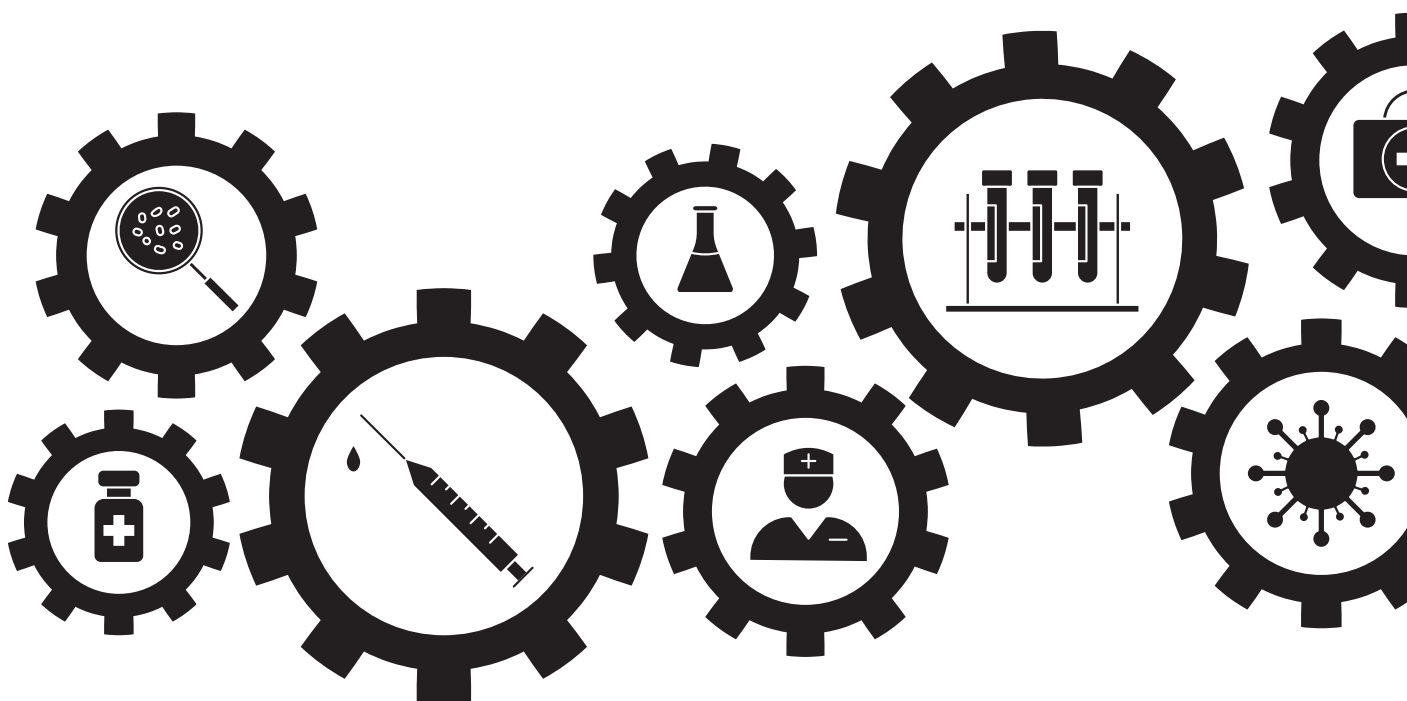
En el campo de la vacunología se han empleado nanopartículas orgánicas e inorgánicas para la formulación de prototipos de nanovacunas. La nanovacunología se refiere al uso de nanopartículas como vehículos de entrega de vacunas. Algunos estudios de prototipos de nanovacunas basadas en nanopartículas metálicas han reportado sus resultados contra la influenza (2015) y contra el dengue (2018). Aunque prometedores, estos prototipos deben ser probados en personas antes de poder comercializarse.

Síntesis y funcionalización para posible uso como nanovacunas

 De manera breve, podemos decir que la síntesis de las nanopartículas metálicas, como las nanopartículas de oro (AuNP) y plata (AgNP), en el caso más sencillo, se lleva a cabo por reacciones de oxidación-reducción entre las sales del compuesto metálico y moléculas capaces de reducirlas. Ejemplos de sustancias reductoras empleadas son el ácido ascórbico, borohidruro de sodio y citrato. Por otra parte, la funcionalización de la nanopartícula se basa en el anclaje de **antígenos** a la superficie de la nanopartícula mediante moléculas conectoras que unen al antígeno con los grupos funcionales expuestos en la superficie de la AuNP. Incluso es posible la unión AuNP-antígeno mediante las interacciones electrostáticas existentes entre estos dos componentes.

Los antígenos utilizados por lo general se obtienen de la estructura del microorganismo (patógeno) que provoca la infección y, una vez anclados, son transportados y dirigidos a células específicas; entonces, se dice que la nanopartícula es el vehículo de entrega que además le confiere protección al antígeno durante su recorrido dentro del cuerpo hasta llegar al sitio de acción. La nanovacuna se integra por

Antígeno
Sustancia o molécula que es reconocida como "extraña" por el organismo y que activa el sistema inmune para la generación de anticuerpos.



dos componentes esenciales: el vehículo (que puede ser una nanopartícula de diferente origen químico) y el antígeno (que será específico de la enfermedad o patógeno). En nuestro grupo de investigación proponemos una síntesis simple de AuNP funcionalizada en una sola reacción, ya que el antígeno empleado es un péptido reductor, lo cual resulta novedoso porque no es necesario incorporar más sustancias para el anclaje del péptido a la superficie de la AuNP.

¿Por qué usar nanopartículas de oro?

 El oro (Au) es un metal con alto valor económico y ha sido, desde tiempos muy antiguos, un elemento asociado a la riqueza. Sin embargo, el oro empleado para la fabricación de prototipos de nanovacunas posee diferentes propiedades físicas de las que podríamos encontrar en artículos de joyería. Las AuNP que pueden emplearse para nanovacunas se obtienen de sales de oro que se encuentran en estado **coloidal**. Además, su síntesis tiene un bajo costo y su naturaleza química las hace compatibles con sistemas biológicos, como el cuerpo humano.

Finalmente, las AuNP poseen gran estabilidad y baja toxicidad dependiente de su tamaño. Por otro

lado, se consideran adyuvantes; es decir, potenciadores del sistema inmune (Burygin y cols., 2009; Dykman y cols., 2004; Dykman y Khlebtsov, 2017), debido principalmente a las características del oro, ya que la superficie de la AuNP puede presentar diversos grupos funcionales que interaccionan con el medio biológico. La capacidad de un adyuvante se clasifica por su entrega dirigida a células blanco o el direccionamiento de una respuesta inmune. En el caso de las nanopartículas, las funciones biológicas son dependientes de su tamaño, forma, carga, naturaleza, entre otras; por lo tanto, su capacidad adyuvante se relaciona con su capacidad de interactuar con el sistema inmune y con el transporte de antígenos.

Es necesario mencionar que todos los sistemas de nanopartículas con características orgánicas e inorgánicas tienen sus ventajas y desventajas. Para los grupos de investigación de este campo, resulta fundamental efectuar un análisis de las cualidades de los sistemas, los beneficios que ofrece y los posibles efectos no deseados.

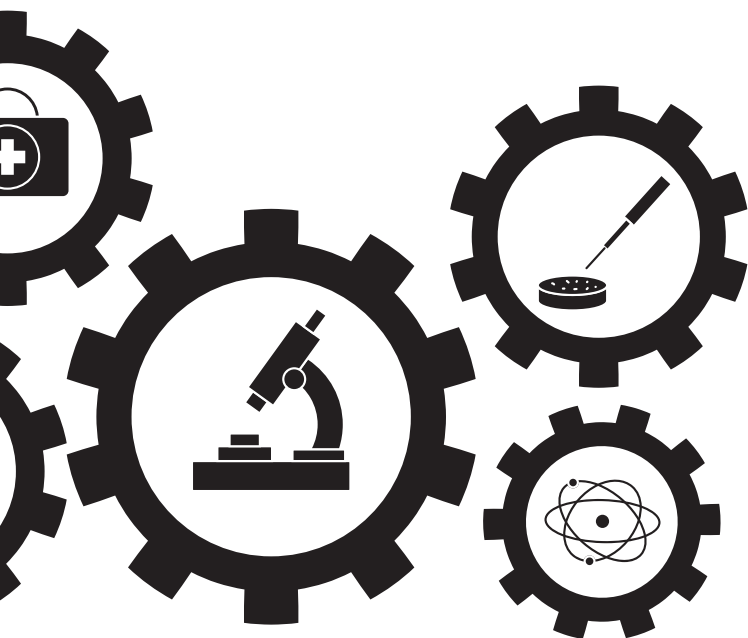
Prototipo de nanovacuna contra enfermedades gastrointestinales

 Se sabe que muchas de las infecciones por bacterias Gram negativas son causantes de enfermedades gastrointestinales. *Vibrio parahaemolyticus*, que origina la vibriosis en crustáceos y peces, tiene una estructura que se distingue por poseer la proteína LptD en su membrana externa (al igual que *E. coli*). La proteína LptD contiene fragmentos (epítopes) compuestos por grupos capaces de reducir sales de oro (agentes reductores); esto hace posible la síntesis química de un prototipo de nanovacuna basada en oro (vehículo de entrega) y el antígeno de LptD. Si bien es cierto que esta bacteria afecta a organismos acuáticos, en humanos provoca gastroenteritis con síntomas como diarrea aguda y deshidratación. Por lo anterior, resulta importante conocer el mecanismo de acción de una nanovacuna candidata primero en mamíferos modelo y posteriormente en humanos, hasta poder considerarla segura y eficaz para su administración a la población.

El mecanismo de síntesis propuesto en nuestro grupo de investigación se basa en las reacciones de

Coloidal

Sustancia en dos o más fases, normalmente en estado líquido y con partículas dispersas.



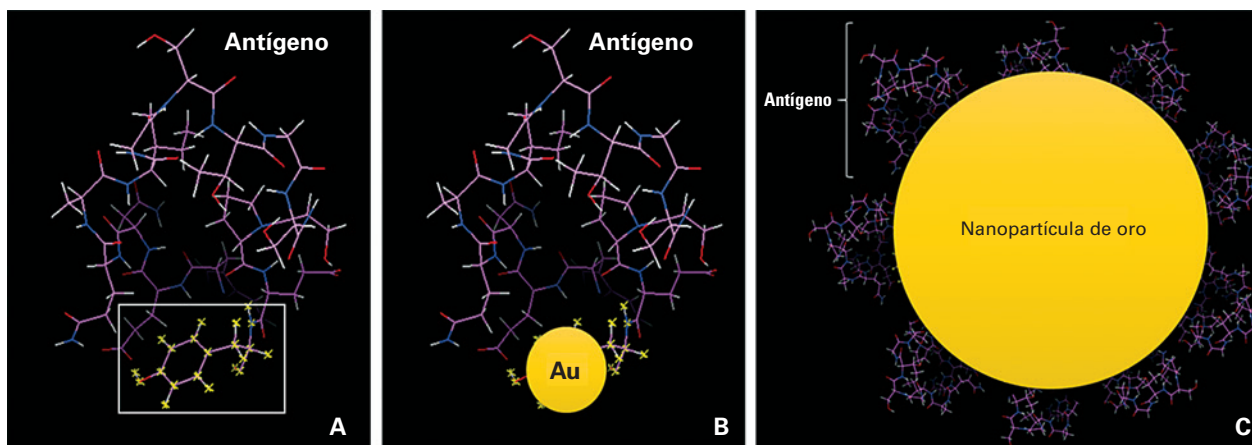


Figura 3. Mecanismo de síntesis del prototipo de nanovacuna: a) área de la estructura del antígeno con mayor afinidad para reducir oro; b) aglomeración de átomos de oro y crecimiento de la AuNP; c) estructura general del prototipo de nanovacuna. Fuente: Aguilera-Juárez (2020).

oxidación-reducción entre sales de metales y un epítope del antígeno de LptD, con lo cual se consigue la formación de la AuNP y su funcionalización en un solo paso: las sales de oro empleadas (tetracloruro de oro, HAuCl_4) donan el catión oro (Au^+) que se reducirá (ganará cargas negativas, es decir, electrones) gracias al alto potencial reductor (proporcionarle gran número electrones) que poseen sitios específicos de la estructura del epítope de LptD. Esto da lugar a una aglomeración de átomos de oro que formarán un cristal, al que llamamos “semilla”, que genera la formación de la AuNP.

De manera paralela, el resto de la estructura del epítope se encontrará unida a la AuNP, con el resultado de un prototipo de nanovacuna estructurada contra

la vibriosis (véase la Figura 3). Este prototipo ha sido caracterizado fisicoquímicamente, encontrándose que tiene un diámetro de 40 a 50 nm (véase la Figura 4). El siguiente paso es evaluarlo a nivel preclínico en un modelo de ratón, con potencial para administración vía oral dadas sus características superficiales.

La AuNP será el vehículo para que el antígeno llegue al sitio de interés dentro del organismo vacunado. De esta manera, se espera que el antígeno sea reconocido por el sistema inmune para que comience a defenderse, ya que lo detectará como un agente extraño. La generación de anticuerpos específicos contrarrestará la infección; consecuentemente, las células de “memoria” detectarán a este antígeno y será más fácil atacar cuando el patógeno

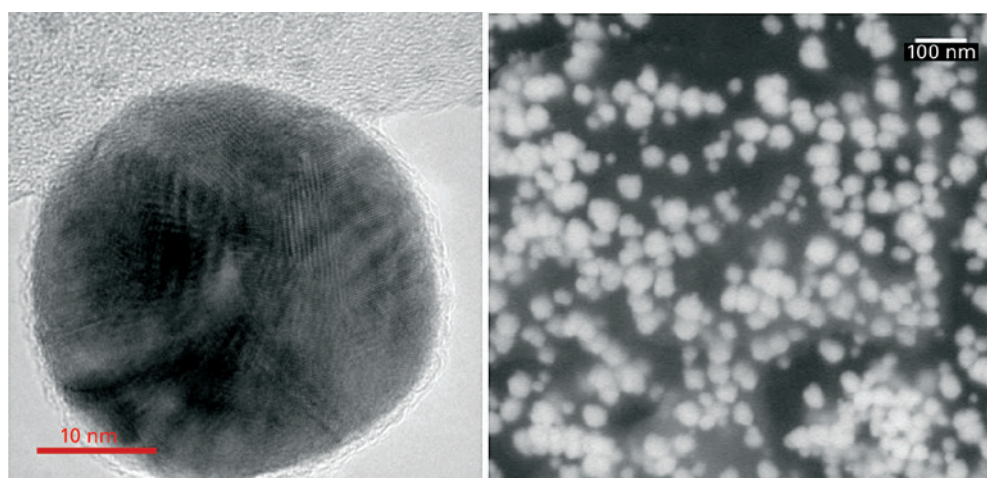


Figura 4. Micrografías del prototipo de nanovacuna contra *Vibrio parahaemolyticus*. Fuente: Aguilera-Juárez (2020).

no ingrese al cuerpo, lo que evita que se propicie la enfermedad.

Conclusiones y perspectivas

Las AuNP tienen varias aplicaciones biomédicas debido a su estabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad, fácil síntesis y funcionalización. Su empleo es una alternativa novedosa sujeta a estudio para la formulación de vacunas. La creación de un prototipo de nanovacuna oral basada en oro contra infecciones generadas por bacterias Gram negativas, como *V. Parahaemolyticus*, representa una posible opción para la prevención de enfermedades comunes adquiridas por la población. Sin embargo, aún hay un camino largo por recorrer para establecer que este prototipo de nanovacuna, así como los desarro-

llados por otros grupos de investigación, reúne los requisitos necesarios para poder ser administrada en humanos y poder cumplir así el objetivo primordial de hacerlas seguras, eficientes y accesibles a toda la población.

Ana Rosa Aguilera Juárez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
aaguilera@pg.cibnor.mx

Carlos Eliud Angulo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
eangulo@cibnor.mx

Luis Hernández Adame

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
ladame@cibnor.mx

Referencias específicas

- Andreescu. D., T. K. Sau y D. V. Goia (2006), "Stabilizer-free nanosized gold sols", *K Colloid Interface Sci*, 298:742-751.
- Burygin, G. L., B. N. Khlebtsov, A. N. Shantrokha, L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev y N. G. Khlebtsov (2009), "On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles", *Nanoscale Research Letters*, 4(8):794-801. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9316-8>, consultado el 24 de agosto de 2020.
- Delany, I., R. Rappuoli y E. de Gregorio (2014), "Vaccines for the 21st century", *EMBO Molecular Medicine*, 6:708-720.
- Dykman, L. A., M. V. Sumaroka, S. A. Staroverov, I. S. Zaitseva y V. A. Bogatyrev (2004), "Immunogenic properties of the colloidal gold", *Izvestiia Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya/Rossiiskaya Akademiia Nauk*, 31(1):86-91.
- Dykman, L. A. y N. G. Khlebtsov (2017), "Immunological properties of gold nanoparticles", *Chemical Science*, 8(3):1719-1735. Disponible en: <doi.org/10.1039/c6sc03631g>, consultado el 24 de agosto de 2020.
- Jeevanandam, J., A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, y M. K. Danquah (2018), "Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations", *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1):1050-1074. Disponible en: <doi.org/10.3762/bjnano.9.98>, consultado el 24 de agosto de 2020.
- Kim, M. G., J. Y. Park, Y. Shon, G. Kim, G. Shim y Y. K. Oh (2014), "Nanotechnology and vaccine development", *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5):227-235. Disponible en: <doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>, consultado el 24 de agosto de 2020.
- Rashmirekha P. et al. (2018), "Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases", *Frontiers in Immunology*, 9:2224.
- Salazar-González, J. A., O. González-Ortega y S. Rosales-Mendoza (2015), "Gold nanoparticles and vaccine development", *Expert Review of Vaccines*, 14(9): 1197-1211. Disponible en: <doi.org/10.1586/14760584.2015.1064772>, consultado el 24 de agosto de 2020.
- Zhou, N. et al. (2006), "Enlargement of gold nanoparticles on the surface of a self-assembled monolayer modified electrode: A mode in Biosensor design", *Anal Chem*, 78:5227-5230.