

# Compuestos inorgánicos como adyuvantes de vacunas

Armando A Paneque-Quevedo

Dirección de Producción, Centro de Química Biomolecular, CQB  
Calle 200 y Ave. 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba  
armando.paneque@cqb.cu, armandopaneque@infomed.sld.cu,  
panecu@yahoo.com

REVISIÓN

## RESUMEN

La propiedad adyuvante de los minerales fue descubierta en 1926, al observarse que una suspensión de toxoide diftérico precipitado con sulfato doble de aluminio y potasio proveía de una inmunogenicidad notablemente superior al toxoide sin adyuvante. Desde entonces se han evaluado numerosas sales inorgánicas como adyuvantes de vacunas y las únicas aprobadas para su uso en seres humanos son la alúmina, el fosfato e hidróxido de aluminio y el sulfato de hidroxifosfato de aluminio. El fosfato de calcio se ha utilizado en algunas vacunas europeas. Las propiedades adyuvantes de las sales inorgánicas son muy dependientes del proceso de obtención e inciden sobre los efectos depósito y presentador atribuidos a estas. La no observancia de ello ha conducido al rechazo de muchas sales con mejores propiedades adyuvantes que las tradicionales sales de aluminio. La aplicación de los últimos avances de la nanotecnología y la alternativa de combinar adyuvantes han motivado la síntesis y evaluación de nuevos adyuvantes. En esta revisión se describen los adyuvantes inorgánicos citados con mayor frecuencia y sus potencialidades para el desarrollo de vacunas más eficaces que las que poseen sales de aluminio como adyuvantes.

**Palabras clave:** adyuvantes inorgánicos, sales de aluminio, alúmina, vacuna

*Biotecnología Aplicada* 2013;30:243-249

## ABSTRACT

**Inorganic compounds as vaccine adjuvants.** The adjuvant capacity of minerals was first discovered in 1926, when a suspension of diphtheria toxoid precipitated with potassium aluminum sulfate was found to be significantly more immunogenic than the same suspension in the absence of this compound. Although a large number of inorganic salts has since been evaluated for this purpose, only alum, phosphate and aluminum hydroxide, and aluminum sulfate hydroxyphosphate have been approved in humans, and calcium phosphate is included in some vaccines manufactured in Europe. In the past, lack of awareness of the fact that the adjuvant properties of inorganic salts are highly dependent on nuances of their production processes that directly affect the depot and presenting effects attributed to adjuvants has led to the rejection of many compounds with potentially better adjuvant properties than traditional aluminum salts. However, the application of recent advances in nanotechnology and the combination of different adjuvants have led to the emergence and evaluation of a large number of new alternatives. The present review describes the most frequently cited inorganic adjuvants, examining their potential for the development of more potent vaccines than the current crop of products using aluminum-based compounds.

**Keywords:** inorganic adjuvants, aluminum salts, alum, vaccine

## Introducción

Los minerales son los constituyentes básicos de la corteza terrestre y los componentes principales de los fertilizantes, los productos químicos, la industria del papel, la pintura y la cosmética. En medicina se emplean como ingredientes farmacéuticos activos o aditivos en formulaciones antiácidas y en suplementos nutricionales; en formulaciones novedosas se emplean como excipientes, transportadores y encapsuladores; y en la formulación de vacunas se emplean como adyuvantes [1-3].

En la actualidad, la vacunación es una de las intervenciones médicas preventivas más efectivas y seguras. Desde su descubrimiento, son el mejor medio para prevenir enfermedades, y se consideran el mayor logro de la salud pública de todos los tiempos [4]. Estas inducen una respuesta inmune más potente y prolongada cuando en su composición química incluyen un adyuvante [5-8].

Los adyuvantes son sustancias que en combinación con los antígenos favorecen la estimulación del sistema inmunitario y aumentan la efectividad de las vacunas. La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa 'ayudar, asistir' [7, 8]. La propiedad adyuvante de los minerales fue descubierta por Gleny

*et al.* en 1926 cuando observaron que una suspensión de toxoide diftérico precipitado con sulfato doble de aluminio y potasio, tenía una inmunogenicidad notablemente superior a la del toxoide sin adyuvante [9].

Los trabajos de revisión más recientes sobre adyuvantes, se enfocan más en aquellos inmunoestimuladores (saponinas-QS21, oligonucleótidos CpG, lipopolisacáridos, monofosforil lípido A, citoquinas), en los de naturaleza lipídica (liposomas, virosomas, *cochleates*), en los llamados particulados (partículas de polaxámero, semejantes a los virus), y solo dedican algunas líneas para comentar las tradicionales sales de aluminio [4, 5].

Muy pocos estudios profundizan en los otros compuestos inorgánicos, dando la falsa idea de que los adyuvantes inorgánicos sólidos son un campo agotado, y que la comunidad científica debe concentrarse más en los adyuvantes provenientes de productos que actúen como fuentes de señales de peligro para el sistema inmunitario. Sin embargo, el adyuvante óptimo para todos los antígenos no se ha encontrado y muchos candidatos muy potentes se han rechazado por problemas de estabilidad, toxicidad y el elevado costo

1. Chang L. *Industrial mineralogy: materials, processes, and uses*. New Jersey: Prentice-Hall; 2001.

2. Carretero MI, Pozo M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries. Part II. Active ingredients. *Appl Clay Sci*. 2010;47:171-81.

3. Reinke CM, Breitkreutz J, Leuenberger H. Aluminum in over-the-counter drugs risks outweigh benefits? *Drug Safety*. 2003; 26(14):1011-25.

4. Harandi AM, Gwyn D, Olesen OF. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(3):293-8.

5. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol*. 2008;38: 2068-71.

6. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res*. 2002;19(6):715-28.

7. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*. 2002;20:24-33.

de los procesos para su obtención [10-12].

Un análisis detallado de las fuentes y el procedimiento para la obtención de los minerales utilizados como adyuvantes sugiere que controlando las condiciones de obtención de algunos de estos y modificando sus propiedades químico-físicas, es posible obtener adyuvantes que solos o unidos a otros adquieren propiedades de adyuvación muy superiores a las de las tradicionales sales de aluminio.

Esta revisión resume información sobre los compuestos inorgánicos sólidos utilizados como adyuvantes en formulaciones vacunales para su uso en seres humanos, en la medicina veterinaria y para la obtención de anticuerpos. Se enfoca en los detalles estructurales de algunos de estos compuestos que, por su importancia, se ha publicado abundantemente información. El resto de los materiales que no se han aplicado en la clínica en formulaciones vacunales, no se discuten de manera pormenorizada; solo se describen los tipos de estudio en que se utilizaron.

### Mecanismo de acción

Los adyuvantes vacunales forman un depósito en el sitio de la inyección, donde se libera lentamente el antígeno y se mantiene durante más tiempo. Este fenómeno provoca una respuesta inmunitaria de mayor intensidad. Por mucho tiempo se consideró que era su único o principal mecanismo de acción [13-16].

Se conoce que las acciones de los adyuvantes son más complejas, y que además de la persistencia física, promueven fenómenos inflamatorios con liberación de citoquinas y una intervención más eficaz de las células presentadoras de antígeno. Ello se debe a su naturaleza particulada y su tamaño inferior a 10 µm, que favorecen su reconocimiento. De este modo, el antígeno se libera al sistema inmunitario de forma más efectiva. También se han descrito los mecanismos de estimulación de células inmunocompetentes mediante la activación del complemento, la inducción de eosinofilia en el sitio de la inyección y la activación de macrófagos [8].

En el año 2008, varios grupos de inmunólogos propusieron que la activación del complejo inflamasoma, un complejo de proteínas con varias funciones en el sistema de defensa natural [5], era otro de los mecanismos de acción. Se considera que el factor que estimula este mecanismo es la naturaleza particulada del adyuvante y no su naturaleza química [17, 18].

### Limitaciones

Las limitaciones de estos adyuvantes incluyen reacciones adversas locales como inflamación, granulomas, abscesos y la inducción de respuestas inmunes caracterizadas por la producción de inmunoglobulina E (IgE), asociadas con reacciones alérgicas. Además, no son tan potentes en la inducción de anticuerpos, ni efectivos en la inducción del patrón auxiliador de células T auxiliaadoras tipo 1 (Th1) protector para microorganismos de vida intracelular, específicamente células T citotóxicas [19-26].

Por lo general, las estructuras cristalinas de estos compuestos se modifican cuando disminuye la temperatura. Se ha postulado que durante la congelación y cristalización del disolvente, las partículas coloidales se concentran en regiones llamadas 'concentrados por congelación'. Las partículas suspendidas en estas re-

giones se aproximan estrechamente unas a otras hasta vencer las fuerzas repulsivas y formar un sistema de partículas coaguladas o aglomeradas. Una vez coaguladas, la suspensión original no se puede reproducir [27]. La ruptura irreversible de la estructura del gel afecta la estabilidad física de las vacunas y, consecuentemente, ocurre una disminución notable de su potencia [28]. Por tales razones, no se logran producir vacunas liofilizadas con estos adyuvantes. Además, se recomienda no almacenarlas en torno a 0 °C.

### Adsorción

El aumento de la respuesta inmune provocada por los adyuvantes inorgánicos depende de sus estructuras, propiedades y mecanismos de adsorción. Se ha postulado que los principales mecanismos de adsorción entre los antígenos y los adyuvantes son las fuerzas de atracción electrostáticas, el intercambio de ligando y las interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, en algunos sistemas se considera que las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno también contribuyen a la adsorción [29-31].

Las propiedades de los adyuvantes inorgánicos que mayor impacto tienen sobre la adsorción son el tamaño medio de la partícula, la morfología y la carga superficial. Esta última es el parámetro más importante para optimizar la adsorción del antígeno. Los adyuvantes con un punto de carga cero por encima del pH fisiológico, estarán cargados positivamente y adsorberán los antígenos cargados negativamente. Mientras que aquellos con puntos de carga cero inferiores al pH fisiológico, adsorberán los antígenos cargados positivamente. Las interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals predominarán cuando los valores del punto de carga cero del adyuvante y del punto isoelectrico del antígeno sean muy similares. El grado de adsorción dependerá de la naturaleza y la concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones como tampones y del pH de la mezcla resultante [32, 33].

Recientemente se planteó que durante la adsorción pueden ocurrir cambios estructurales en el antígeno adsorbido. Esta transformación estructural puede incrementar la susceptibilidad del antígeno a los procesos de proteólisis por el sistema inmunitario y favorecer la presentación del antígeno [34, 35].

### Compuestos inorgánicos empleados como adyuvantes

#### Sales de aluminio

Las sales de aluminio son los adyuvantes más utilizados en la vacunología. El primer adyuvante que se usó fue el sulfato doble de aluminio y potasio ( $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$ ), para la obtención de los aluminatos de toxoide tetánico (TT) y toxoide diftérico. Sus características son muy similares a las del fosfato de aluminio [36].

El hidróxido y fosfato de aluminio y posteriormente el sulfato de hidroxifosfato de aluminio son los únicos adyuvantes de aluminio aprobados para emplear en las vacunas licenciadas actualmente para seres humanos. La cantidad de aluminio está limitada a no más de 0.85 mg/dosis, en EE.UU. En 1981, el nivel permisible se elevó hasta 1.25 mg, en Europa. A continuación se resumen algunas vacunas aprobadas

8. Gupta RK. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32: 155-72.

9. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:287-93.

10. Lahiri A, Das P, Chakravorty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine.* 2008;26:6777-83.

11. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, NLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009;21(4):317-37.

12. Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. *Hum Vaccine.* 2008;4(5):347-9.

13. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine.* 2004;22: 3658-68.

14. Glenn AT, Buttle GAH, Stevens MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol.* 1931;34:267-75.

15. Holt LB. Developments in diphtheria prophylaxis. London: William Heinemann, Ltd.; 1950.

16. Ramanathan VD, Badenoch-Jones P, Turk JL. Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology.* 1979;37:881-8.

17. Harris J, Sharp FA, Lavelle Ed. C. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *Eur J Immunol.* 2010;40:595-653.

18. Shar AF, Ruane D, Claas B, Creagh E, Harris J, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(3):870-5.

19. Esch HH. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:S34-S39.

20. Davenport FM, Hennessy AV, Askin FB. Lack of adjuvant effect of AIPO4 on purified influenza virus hemagglutinins in man. *J Immunol.* 1968;100(5):1139-40.

21. Cvjetanovic B, Uemura K. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. *Bull WHO.* 1965;32:29-36.

22. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Bittle JL, Houghton RA, Lerner RA, et al. Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology.* 1987;61:1-6.

23. Bomford R. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines.* New York: Plenum Publishing Corp.; 1989. p. 35-41.

24. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Brown F, Bittle JL, Houghton RA, et al. Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol.* 1985;66:2347-54.

25. Lew AM, Anders RF, Edwards SJ, Langford CJ. Comparison of antibody avidity and titre elicited by peptide as a protein conjugate or as expressed in vaccinia. *Immunology.* 1988;65(2):311-4.

Tabla. Vacunas con adyuvantes inorgánicos aprobadas para su uso en seres humanos

Tipo de vacuna	Vacuna	Adyuvante	Contenido de Al <sup>3+</sup>	Productor
Antimeningocócica BC	VA-Mengoc-BC®	Al(OH) <sub>3</sub>	2 mg	Instituto Finlay, Cuba
Antineumocócica	Prevenar®	AlPO <sub>4</sub>	0.125 mg	Wyeth Pharmaceuticals Inc.
	Prevenar 13®	AlPO <sub>4</sub>	0.125 mg	
Ántrax absorbido	BioThrax®	Al(OH) <sub>3</sub>	1.2 mg/mL	BioPort Corporation
DT	DT adsorbidos USP	Alúmina	≤ 0.25 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Decavac®		≤ 0.28 mg	
	Td (genérico)		≤ 0.28 mg	
DTaP	Boostrix®	Alúmina	≤ 0.39 mg	GlaxoSmithKline
	Infanrix®	Al(OH) <sub>3</sub>	≤ 0.625 mg	
	Kinrix®*	Al(OH) <sub>3</sub>	≤ 0.6 mg	
	Adacel®	AlPO <sub>4</sub>	1.5 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Daptacel®	AlPO <sub>4</sub>	0.33 mg	
	Tripedia®	Alúmina	≤ 0.17 mg	
DTaP y Hib	TriHIBit®	Alúmina	≤ 0.17 mg	Sanofi Pasteur Inc.
DTaP, hepatitis B, IPV	Pediarix®	AlPO <sub>4</sub> y Al(OH) <sub>3</sub>	0.85 mg	GlaxoSmithKline
DTaP, IPV, Hib	Pentacel®	AlPO <sub>4</sub>	0.33 mg	Sanofi Pasteur Inc.
Hepatitis A inactivada	Havrix®	Al(OH) <sub>3</sub>	0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Vaqta®	Al(OH) <sub>3</sub>	0.45 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis B	Enerix-B®	Al(OH) <sub>3</sub>	≤ 0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Recombivax HB®	Al(OH) <sub>3</sub>	≤ 0.5 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis A y B	Twinrix®	AlPO <sub>4</sub> y Al(OH) <sub>3</sub>	0.45 mg/mL	GlaxoSmithKline
Hib	PedvaxHIB®	Al <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH) (SO <sub>4</sub> )	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
Hib y hepatitis B	Comvax®	Al(OH) <sub>3</sub> amorfo	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV	Cervarix®	Al(OH) <sub>3</sub>	0.5 mg	GlaxoSmithKline
	Gardasil®	Al <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH) (SO <sub>4</sub> )	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
HPV tetravalente	Gardasil®	Al <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH) (SO <sub>4</sub> )	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV2 bivalente	Cervarix®	ASO4 (Al(OH) <sub>3</sub> )	0.5 mg	GlaxoSmithKline
Hepatitis B	Fendrix®	ASO4 (Al(OH) <sub>3</sub> )	0.5 mg	GlaxoSmithKline
TT adsorbido	IPAD-T	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1-3 mg/mL	Instituto Pasteur, Francia

DT: toxoide diftérico y toxoide tetánico; DTaP: toxoide diftérico, toxoide tetánico y pertusis acelular; Hib: *Haemophilus influenzae*, tipo B; HPV: papilomavirus humano; IPV: vacuna de antipoliomielítica inactivada; TT: toxoide tetánico.

\* Kinrix® incluye además la IPV.

para uso en seres humanos que emplean adyuvantes inorgánicos (Tabla) [37].

Stanley L Hem *et al.* estudiaron la naturaleza químico-física del hidróxido y el fosfato de aluminio, y demostraron que el hidróxido de aluminio como adyuvante es un sólido cristalino [38-41]. Su estructura se corresponde con la del mineral oxihidróxido de aluminio (AlO(OH)), conocido como bohemita, que tiene una morfología en forma de fibras con un tamaño promedio de partícula primario de 4.5 × 2.2 × 10 nm. Ello le proporciona una gran superficie para la adsorción de los antígenos. El punto de carga cero tiene un valor de pH entre 9 y 11. Se comercializa bajo la marca Alhydrogel [38-41].

El AlPO<sub>4</sub> es un sólido amorfo, no estequiométrico, con una relación variable de OH-PO<sub>4</sub>, que responde a la fórmula química de Al(OH)<sub>m</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>. Su morfología es en láminas y el tamaño primario de la partícula es de alrededor de 50 nm. Su punto de carga cero tiene un valor de pH entre 5 y 7. Se comercializa bajo el nombre de Adju-Phos [42].

En estos complejos, el acuo-ión Al<sup>3+</sup> ocupa posiciones tetraédricas y octaédricas. La carga neta superficial de estos dos adyuvantes influye en el modo de unirse a los antígenos, y en su liberación después de la inyección y exposición al suero fisiológico, el cual es muy próximo al pH neutro [41]. En disolución, ambos adyuvantes forman agregados porosos con diámetros que varían de 1 a 10 nm.

Las velocidades de disolución de estos dos adyuvantes en el fluido intersticial *in vitro* e *in vivo* también

son diferentes. El fosfato se disuelve relativamente rápido, mientras que el hidróxido es difícil de disolver *in vitro*, y puede persistir por periodos prolongados *in vivo*. La disolución de estas sales se favorece por la presencia de los ácidos plasmático, cítrico, láctico, málico, etc. Se calcula que al mes ya se ha solubilizado y pasado a la circulación sanguínea el 17 % si es con hidróxido y el 51 % si es con fosfato de aluminio [42].

#### Sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo

El sulfato de hidroxifosfato de aluminio (Al<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH) (SO<sub>4</sub>)) es un compuesto producido por la compañía química farmacéutica Merck. Su estructura se parece más a la del fosfato de aluminio, pero sus propiedades difieren entre sí. Posee una estructura amorfa en malla y su punto de carga cero es de 7. Se utiliza como adyuvante en una vacuna contra el virus del papiloma humano. Tiene mayor afinidad para unirse y estabilizar las partículas similares a virus (VLP) que las otras sales de aluminio [43].

#### Cloruro de aluminio

El cloruro de aluminio es un compuesto anfótero que se disuelve en agua y forma hidróxido de aluminio. Se utilizó como adyuvante para aumentar los volúmenes de antiseros contra el veneno de la cobra [44, 45].

#### Hidroxicarbonato de aluminio

El hidroxicarbonato de aluminio (Alum HC) se forma cuando el anión carbonato se une al aluminio en la estructura del gel de hidróxido de aluminio. Frecuen-

26. Geerligts HJ, Weijer WJ, Welling GW, Welling-Wester S. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising amino acid residues 9-21 of herpes simplex virus Type 1. *J Immunol Methods*. 1989;124(1):95-102.

27. Tripathy T, Ranjan D. Flocculation: A New Way to Treat the Waste Water. *J Phys Sci*. 2006;10:93-127.

28. World Health Organization. Temperature sensitivity of vaccines. WHO/IVB/06.10. Geneva: World Health Organization; 2006.

29. Rinella JV, White JL, Hem SL. Effect of pH on the Elution of Model Antigens from Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;205(1):161-5.

30. Al-Shakhshir R, Regnier F, White JL, Hem SL. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 1994;12(5):472-4.

31. Al-Shakhshir R, Lee AL, White JL, Hem SL. Interactions in Model Vaccines Composed of Mixtures of Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;169:197-203.

32. Seeber SJ, White JL, Hem SL. Predicting the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 1991;9(3):201-3.

33. Clapp T, Siebert P, Chen D, Braun LJ. Vaccines with Aluminum-Containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability. *J Pharm Sci*. 2011;100(2):388-401.

temente se utiliza como antiácido. Su efecto adyuvante se comparó con el de otros 24 adyuvantes, para la inducción de la respuesta inmune humoral contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2) en ratones. Se demostró que, al igual que los otros adyuvantes de aluminio, induce anticuerpos contra la proteína gp120 de la envoltura externa [46].

### Silicato de aluminio

Los silicatos de aluminio ( $Al_2SiO_5$ ) aparecen en la naturaleza como formas hidratadas. Se han usado ampliamente en la industria farmacéutica y dental. La bentonita al 1 % es la forma estudiada como adyuvante en vacunas. Se ensayó para aumentar la respuesta de IgE en animales de experimentación con resultados positivos en la producción del anticuerpo IgG1. Su comportamiento fue similar al compararlo con la alúmina [47]. También se empleó al 2 % en un estudio para evaluar la eficacia de cuatro adyuvantes en el aumento de los volúmenes de anticuerpos contra la rabia en caballos [48].

En un estudio más reciente en ovejas se demostró que la vacuna de enterotoxemia adsorbida en bentonita es mejor, desde el punto de vista económico, que la adsorbida en sulfato doble de aluminio y potasio [49].

### Métodos de obtención de las sales de aluminio

Los óxidos e hidróxidos de aluminio se preparan generalmente adicionando disoluciones de NaOH o  $NH_3$  a una disolución de alguna sal de aluminio ( $AlCl_3$ ,  $KAl(SO_4)_2 \times 12H_2O$ ). Los otros compuestos se obtienen de igual manera, pero adicionando, al mismo tiempo, una sal de fosfato ( $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ), bicarbonato o sulfato, etc. Las propiedades del gel resultante, que incluyen el área y la carga superficial, la composición química y la estructura dependen notablemente del proceso de producción. Diversos factores como el pH, la temperatura, la concentración y los parámetros técnicos (la geometría del reactor y la velocidad de mezclado), entre otros, influyen en la calidad del gel resultante, que se mide por el contenido de aluminio y de algunos iones (nitratos, sodio, cloruros, sulfatos), la esterilidad, la viscosidad, las propiedades de sedimentación, la capacidad adsorbida, el punto de carga cero, entre otros [50].

Durante el proceso de obtención de estos geles se forman varias estructuras hidratadas amorfas con diferentes especies de aluminio en equilibrios múltiples. Por ejemplo, en una disolución acuosa a valores de pH menores de 3, el aluminio existe como el acuó ión complejo  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ , usualmente abreviado como  $Al^{3+}$ . Al aumentar ligeramente el pH, el  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$  experimenta un proceso de desprotonación sucesiva, formando el ión  $[Al(H_2O)_5(OH)]^{2+}$  y una serie de hidrocomplejos [51, 52]. A un pH cercano a 7 comienza la precipitación del  $Al(OH)_3$ . Finalmente, a pH básico, el  $Al(OH)_3$  se redisuelve y se forma el ión aluminato  $[Al(OH)_4]^-$ .

### Sales de calcio

#### Fosfato de calcio

El fosfato de calcio fue originalmente desarrollado por el Profesor Edgar H Relyveld, del Instituto Pasteur, como alternativa a los adyuvantes de aluminio. Desde entonces se empleó como adyuvante en las vacunas

contra la difteria, el tétano, la tosferina, la poliomié- litis, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), la fiebre amarilla, el sarampión, la hepatitis B y varios alérgenos [53-55].

Aunque tiene propiedades similares a los compues- tos de aluminio, esta sal posee varias ventajas poten- ciales. Es un constituyente normal del cuerpo humano y, como tal, es bien tolerada; adsorbe eficientemente los antígenos y se libera lentamente; y genera nive- les elevados de anticuerpos IgG. No incrementa la producción de IgE, por lo que es más segura contra reacciones adversas a largo plazo, que solo se pue- den reconocer después de muchos años en la etapa de poscomercialización de las vacunas. Tras la adminis- tración de vacunas contra *Bordetella pertussis* adsor- bidas con este adyuvante se han observado reacciones neurológicas esporádicas. La Organización Mundial de la Salud y la farmacopea Europea recomiendan una concentración límite de 1.3 mg de calcio/dosis [56].

El fosfato de calcio adyuvante tiene una compo- sición química cercana a la fórmula  $Ca_3(PO_4)_2$ . Mediante las técnicas de difracción de rayos X, la espec- troscopía infrarroja, el análisis térmico, entre otras, se demostró que el fosfato de calcio comercial es una hidroxapatita no estequiométrica:  $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ . La  $x$  varía de cero a dos. La carga su- perficial es dependiente del pH y su punto de carga cero es igual a 5.5. Como consecuencia, presenta una carga superficial negativa al pH fisiológico y adsorbe electrostáticamente antígenos con carga positiva. La presencia de los grupos hidroxilos permite al adyu- vante adsorber antígenos fosforilados por intercam- bio de ligando con los hidroxilos superficiales [57].

Las propiedades del adyuvante son notablemente dependientes de las condiciones de precipitación al igual que las sales de aluminio. El precipitado de fos- fato de calcio obtenido mediante la mezcla rápida de los reaccionantes, adsorbe el 100 % de toxoide difté- rico, mientras que el producido con la adición lenta solo adsorbe el 58 % de la misma dosis de toxoide diftérico. Esto se debe a que la relación molar Ca/P en el complejo varía de 1.35 a 1.83 en función de la velocidad de mezclado [58].

Recientemente se han sintetizado nanopartículas de fosfato de calcio con mejores propiedades adyuvantes y químico-físicas, muy diferentes al fosfato de calcio utilizado tradicionalmente como adyuvante [59]. Esta nueva forma provoca poca inflamación en el sitio de aplicación de la vacuna, induce mayores respuestas IgG2a y menores respuestas IgE cuando se compara con los adyuvantes de aluminio. Se plantea que su uso puede ser una buena alternativa para antígenos vira- les. Además, estas nanopartículas se evaluaron como adyuvantes en vacunas de administración intranasal, para generar respuestas inmunomucosales en modelos animales [59-62]. Este fosfato de calcio nanoestructu- rado es un buen ejemplo de cómo modificando el tama- ño y la morfología de una sustancia conocida se puede lograr otra con propiedades adyuvantes superiores.

#### Alginato de calcio

El alginato de calcio se forma a partir del alginato de sodio. Este último polimeriza en presencia de calcio y forma depósitos con el antígeno adsorbido. Su efecto adyuvante se estudió en ratones para la generación de

34. Peek JL, Russell Midaugh C, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:915-28.

35. Jones LS, Peek LJ, Power J, Markham A, Yazzie B, Midaugh R. Effects of Ad- sorption to Aluminum Salt Adjuvants on the Structure and Stability of Model Pro- tein Antigens. *J Biol Chem.* 2005;280(14): 13406-14.

36. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:497-505.

37. Baylor NW, Egan W, Richman P. Alu- minium salts in vaccines-US perspective. *Vaccine.* 2002;20:S18-S23.

38. Clausi A, Cummsiskey J, Merkley S, Carpenter J, Braun LJ, Randolph TW. Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5252-62.

39. Shirodkar S, Hutchinson RL, Perry DL, White JL, Hem SL. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharm Res.* 1990;7(12):1282-8.

40. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phos- phate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. *Vaccine.* 2001;19:275-81.

41. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phos- phate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part II: physicochemical properties. *Vaccine.* 2001;19:282-7.

42. Hem SL. Elimination of aluminum ad- juvants. *Vaccine.* 2002;20:S40-S43.

43. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Henryck Mach, et al. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Hum Vaccines* 2007;3(4):139-46.

44. Kawamura Y, Sawai Y. Study on In- dian Cobra Venom toxoid. *Snake.* 1989; 21:6-8.

45. Kawamura Y, Sawai Y. Study on the immunogenicity of purified toxoid of Si- amese Cobra (*Naja Naja kaouthia*) Venom. *Snake.* 1989;21:81-4.

46. Stieneker F, Kersten G, van Bloois L, Crommelin DJ, Hem SL, Löwer J, et al. Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as an- tigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations. *Vaccine.* 1995;13(1):45-53.

47. Fujimaki H, Ozawa M, Imai T, Kubota K, Watanabe N. Adjuvant effects of alu- minium silicate on IgE and IgG1 antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984;75(4):351-6.

48. Arora S, Sharma S, Goel SK, Singh US. Effect of different adjuvants in equines for the production of equine rabies immuno- globulin. *Natl Med J India.* 2005;18(6): 289-92.

49. Basavalingappa BS, Krishnamurthy GV, Suryanarayana VVS, Byregowda SM, Isloor S, Mayanna A, et al. Immune response of sheep to bentonite clay and alum adju- vanted enterotoxaemia vaccines. *Indian J Animal Sci.* 2008;78(4):339-41.

anticuerpos contra el veneno de *Bothrops asper*. Su eficacia también se ha evaluado en vacunas antibacterianas, antivirales y antitoxoides en ratones, y se ha demostrado que es más efectivo en la producción de anticuerpos que con las otras vacunas antitifoideas [63]. Su propiedad adyuvante es inferior a la del adyuvante de Freund y no ejerce acción adyuvante cuando se une al toxoide diftérico [64, 65].

#### Cloruro de calcio

El cloruro de calcio mezclado con liposomas (que forma cocleatos de estructura cilíndrica) se ha evaluado como adyuvante en vacunas administradas por vía intranasal para generar respuesta inmune mucosal en modelos de animales [66]. Más recientemente se ha demostrado su eficacia en la formulación AMVAD (*archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery*) basada en lípidos de arqueobacterias, administrada por vía intranasal para promover una respuesta inmune sistémica duradera en ratones [67].

#### Compuestos de magnesio

El hidróxido de magnesio cristalino se ha empleado en una mezcla de igual proporción con hidroxicarbonato de aluminio amorfo. Se conoce comercialmente con el nombre de Imject Alum®. Su efectividad se demostró en ratones, pero no se ha empleado en vacunas para seres humanos [68, 69].

Otra sal de magnesio estudiada fue el hidroxicarbonato de magnesio pentahidratado. En ratones se demostró que es más potente para inducir anticuerpos específicos a TT que el hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante [70].

#### Sales de hierro

##### Fosfato de hierro

El fosfato de hierro es un compuesto amorfo con un tamaño de partícula promedio entre 0.01 µm y 300 µm. Estudios en ratones indicaron que su grado de tolerancia es similar al hidróxido de aluminio. Posee la propiedad de incrementar los niveles de IgG1; pero no es superior cuando se compara con el hidróxido de aluminio; aunque sí mayor al hidróxido de hierro. Su cantidad está limitada entre 0.2 y 1.4 mg de hierro por dosis [71].

##### Hierro coloidal

El hierro coloidal está constituido por una mezcla de hidróxido y de óxido de hierro (III), que puede tener diferentes grados de hidratación y estequiometría. Tiene un tamaño de partícula entre 1 y 500 nm, y su capacidad adyuvante es similar a la del hidróxido de aluminio. Sin embargo, tiene la ventaja de potenciar la generación de linfocitos T citotóxicos. En animales de experimentación (ratones) se demostró que aumenta la inmunogenicidad del TT y del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) inactivado. Este tipo de coloide posee propiedades de adsorción superiores a la del hidróxido de hierro en forma de gel, por lo que adsorbe un mayor número de proteínas [72, 73].

##### Hierro carbonílico

El hierro carbonílico se caracteriza por formar partículas esféricas con un potente efecto adyuvante en

la inducción de encefalomielititis alérgica en ratas. La actividad adyuvante también se encontró en suspensiones de Kaolin, pero no en otras formas del hierro metálico, como el óxido de hierro y el hierro dextrana. El hierro carbonílico podría convertirse en un material útil para la investigación de los mecanismos de adyuvación y de inmunología celular por sus propiedades magnéticas y fácil detección [74].

Con respecto a otros, los adyuvantes de hierro descritos tienen la desventaja de que sus áreas superficiales son pequeñas, lo que significa que consiguen una menor adsorción de antígenos. Además, estos compuestos son absorbidos en menor magnitud y velocidad por el organismo.

#### Compuestos de cinc

##### Óxido de cinc

El efecto adyuvante del óxido de cinc se ha evaluado en ratones y se demostró que actúa sobre el sistema inmune estimulando la respuesta Th2. Otros estudios sugieren que el óxido de cinc es un adyuvante más seguro que el hidróxido de aluminio porque estimula la respuesta inmune con mayor potencia, posee baja toxicidad e induce una débil respuesta alérgica [75, 76].

##### Sulfato de cinc

El sulfato de cinc se empleó como adyuvante en formulaciones para tratamiento tópico [77]. Además se estudió su efecto sobre la respuesta inmunológica de una vacuna recombinante de hepatitis B en ancianos. La investigación reveló que el sulfato de cinc no ejerce ningún efecto sobre los niveles de inmunidad en los ancianos [78].

##### Hidróxido de cinc

Se ha descrito que el hidróxido de cinc tiene propiedades adsorbentes ante proteínas y antígenos. En ratones y cerdos se demostró que estimula tanto la respuesta inmune celular como la humoral. La adición de lecitina aumenta el efecto adyuvante e incrementa la tolerancia local de las vacunas con hidróxido de cinc [78].

El hidróxido de cinc, combinado con hidróxido de calcio, lecitina y poli-alfa-olefina hidrogenado tienen una propiedad adyuvante superior al de estas sales por separado.

En otros estudios en ratones y cerdos también se evaluaron el cloruro y el acetato de cinc y se demostró que no tienen efecto adyuvante medible y que poseen una baja tolerancia local [78].

#### Cloruro de manganeso

El efecto adyuvante del cloruro de manganeso se experimentó en ratones. Tiene la propiedad de aumentar la actividad de las células citotóxicas naturales (NK). Actúa de forma similar a aquellas moléculas más complejas que inducen la producción de interferón [79-81].

#### Sales de circonio

Se han evaluado varias sales de circonio: lactato de sodio y circonio, lactato de circonio y aluminio, oxiclóruo de circonio, glicinato de aluminio y circonio e hidróxido de circonio. Se ha encontrado que estos

50. Matheis W, Zott A, Schwaniig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine*. 2002;20:67-73.

51. De Oliveira EC, Moita JM, Fujiwara FY. Aluminum Polyphosphate Thermoreversible Gels: A Study by 31P and 27Al NMR Spectroscopy. *J Colloid Interface Sci*. 1995;176(2):388-96.

52. Teagarden DL, Kozlowski JF, White JL, Hem SL. Aluminum chlorohydrate I: Structure studies. *J Pharm Sci*. 1981;70(7):758-61.

53. Coursaget P, Yvonne B, Relyveld EH, Barres JL, Diop-Mar I, Chiron PJ. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunisation programme: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis and hepatitis B surface antigens. *Infect Immun*. 1986;51(3):784-7.

54. Relyveld EH. A history of toxoids. In: Plotkin SA, Fantini B, editors. *Vaccinia, vaccination, vaccinology*. New York: Elsevier; 1996. p. 95.

55. Relyveld EH, Hi-Nocq E, Raynaud M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull World Health Org*. 1964;30:321-5.

56. Gupta RK, Siber GR. Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals*. 1994;22(1):53-63.

57. Jiang D, Premachandra GS, Johnston C, Hem SL. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine*. 2004;23:693-8.

58. Relyveld EH. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand*. 1986;65:131-6.

59. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. Calcium phosphate nanoparticles adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):899-903.

60. Abd el-Razek NEE, Shoman SA, Mohamed AF. Nanocapsulated Rift Valley Fever vaccine candidates and relative immunological and histopathological reactivity in out bred Swiss mice. *J Vaccines Vaccin*. 2011;2:115.

61. He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJ. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):1021-4.

62. Contorni M, Singh M, Derek O'Hagan D, inventors; Novartis, assignee. Compositions with antigens adsorbed to calcium phosphate. United States patent US 20090035326. 2009 Feb 5.

63. Sterne M, Trim G. Enhancement of the potency of typhoid vaccines with calcium alginate. *J Med Microbiol*. 1970;3(4):649-54.

64. Shapiro A, Modai Y, Kohn A. Efficacies of vaccines containing alginate adjuvant. *J Appl Microbiol*. 1967;30(2):304-11.

65. Kohn A, Helering I, Ben-Efraim S. Adjuvant properties of alginate in bacterial, viral and protein vaccines. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1969;36(1-2):156-62.

compuestos estimulan la respuesta inmune a partir de una mayor producción de anticuerpos IgM en ratones. Aunque no se explica detalladamente, se plantea que induce una producción de anticuerpos prolongada.

Con la excepción del hidróxido de circonio ( $Zr(OH)_4$ ), se ha encontrado que existe una relación entre la propiedad de estos compuestos de inducir una inflamación crónica y de activar la cascada del complemento en cerdos [16, 82].

#### Nitrato de cerio

El nitrato de cerio ( $Ce(NO_3)_4$ ) existe en varias formas. La más utilizada en medicina es la sal hidratada ( $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ ). En la actualidad el nitrato de cerio se emplea como adyuvante en cremas de sulfadiazina de plata. También se evaluó *in vitro* la propiedad del óxido de cerio de adsorber proteínas y su captación por las células de adenocarcinoma del pulmón [83].

#### Sales de berilio

En un estudio en ratones susceptibles a *Leishmania* spp., se demostró que el sulfato de berilio actúa como un adyuvante que promueve significativamente la producción de interferón gamma ( $IFN-\gamma$ ). La propiedad del berilio de sinergizar con la interleuquina 12 (IL-12) para promover la producción de citoquinas de patrón Th1, es un elemento importante que se pudiera evaluar para su desarrollo como adyuvante de vacunas [84]. El óxido de berilio ( $Be(OH)_2$ ) se ha explorado como adyuvante en animales de experimentación [85].

#### Óxidos

##### Aerosil

El aerosil 200 (11 % w/v) es el dióxido de silicio muy disperso que se emplea como sustancia auxiliar en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. Esta forma del dióxido de silicio se distingue por sus propiedades hidrófilas. El aerosil R972 (1 %, p/v) es un dióxido de silicio hidrófobo muy disperso. Se utiliza en la obtención de comprimidos a partir de polvos o gránulos higroscópicos [46]. Ambos óxidos se evaluaron en ratones con antígenos del VIH-2 inactivado, y se demostró que inducen anticuerpos contra la glicoproteína de la membrana externa del virus gp120.

##### Otros óxidos

Las propiedades adyuvantes de la sílica ( $SiO_2$ ), el talco ( $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ ), y los compuestos  $Al_2O_3$ , óxidos de estaño ( $SnO_2$ ), óxidos de circonio ( $ZrO_2$ ), la hematita ( $Fe_2O_3$ ) y la magnetita ( $Fe_3O_4$ ) se evaluaron en ratas utilizando como antígeno la proteína ovoalbúmina [86]. En ese estudio se concluyó que la respuesta de anticuerpos aumentó moderadamente al administrar el óxido de aluminio, la hematita y la magnetita. Los óxidos de estaño y circonio provocaron un efecto muy pequeño. En ese estudio no se pudo correlacionar la hidrofobicidad e hidrofiliadad de los óxidos con la magnitud de sus efectos adyuvantes.

#### Mezclas de adyuvantes

##### Algamulina

Cooper *et al.* [87] combinaron el hidróxido de aluminio con la gamma inulina, polisacárido procedente

de algas, aprovechando que la inulina es un potente activador natural de la vía alternativa del complemento. Esta combinación conocida como algamulina ha potenciado la respuesta contra diversos antígenos comerciales, como toxoide diftérico y TT, el virus sincitial respiratorio y la proteína E7 del virus del papiloma humano [87].

#### AS04

El AS04 (sistema adyuvante 04) es uno de los pocos adyuvantes modernos e innovadores autorizado para su uso en la formulación de vacunas profilácticas para seres humanos. Su principal novedad es la asociación de dos adyuvantes de actividad complementaria: el clásico hidróxido de aluminio y el monofosforil lipido A (MPL). El MPL es un lipopolisacárido obtenido de *Salmonella minnesota* que es purificado y detoxificado, pero que mantiene intacta su propiedad de unirse al receptor similar a Toll 4 (TLR-4). El adyuvante AS04 se ha utilizado en una vacuna contra el virus de la hepatitis B (comercializada como Fendrix®), indicado preferentemente en enfermos en hemodiálisis y situaciones de inmunosupresión. También se ha utilizado en una vacuna contra el virus del papiloma humano (comercializada como Cervarix®) [88].

#### Imject Alum®

El hidróxido de aluminio-hidróxido de magnesio se conoce comercialmente como Imject Alum® (Pierce Biotechnology, USA). Es una mezcla en igual proporción de hidroxycarbonato de aluminio amorfo con el hidróxido de magnesio cristalino. Su composición es similar al antiácido Maalox®. Se ha usado solo en ensayos con animales, y se plantea que es un adyuvante muy efectivo. Su acción transcurre por la activación del inflammasoma NLRP3 [89].

Vale destacar que la mezcla de adyuvantes podría convertirse en una buena alternativa ante la ausencia de un adyuvante que induzca una intensa y prolongada respuesta Th2 mediada por anticuerpos y una potente respuesta Th1, la cual es fundamental para combatir virus y bacterias intracelulares. Además, en la composición de la mezcla pudiera incluirse un transportador que garantizaría que la respuesta inmune inducida por la vacuna no solo sería más eficaz sino también dirigida.

#### Consideraciones

La mayor parte de los adyuvantes inorgánicos se utilizan en forma de gel, a pesar de reportes previos de sales solubles en agua de metales divalentes y trivalentes que han demostrado ser eficaces adyuvantes, como el gluconato de calcio, el gluconato de manganeso, el glicerofosfato de manganeso, el acetato de aluminio y el salicilato de aluminio [90]. La calidad de estos geles varía según el fabricante y no siempre poseen el efecto adyuvante deseado. Por ello, cada productor de vacuna trata de desarrollar su propio adyuvante [91].

En la mayoría de los estudios que evalúan para tales fines a esta familia de compuestos, se han utilizado las sales disponibles comercialmente sin tener en cuenta sus propiedades químico-físicas, como el polimorfismo, la constante de solubilidad, la energía de la red, la naturaleza del enlace (covalente o iónico), el pH del

66. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scopolino AJ, Wang Z, Zhang F, *et al.* Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32(3):273-87.

67. Patel GB, Zhou H, Ponce A, Chen W. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaean lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine.* 2007;25(51):8622-36.

68. Lambrecht BN, Kool M, Willart M, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:23-9.

69. Munks MW, McKee AS, Macleod MK, Powell RL, Degen JL, Reisdorph NA, *et al.* Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. *Blood.* 2010;116(24):5191-9.

70. Kristensen N, Uldal J, Aasmul-Olsen S, Lund L, inventors; ALK-Abello A/S, assignee. Parenteral vaccine formulations and uses thereof. United States patent US 7785611 B2. 2010 Aug 31.

71. Sauzeat E, inventor; Sanofi Pasteur S.A., assignee. Vaccine composition comprising iron phosphate as vaccine adjuvant. United States patent US 06927235. 2005 Aug 9.

72. Eibl J, Leibl H, Mannhalter J, inventors; Tempo G, assignee. Adjuvant based on colloidal iron compounds. United States patent US 5895653. 1999 Apr 20.

73. Leibl H, Tomasits R, Brühl P, Kerschbaum A, Eibl MM, Mannhalter JW. Humoral and cellular immunity induced by antigens adjuvanted with colloidal iron hydroxide. *Vaccine.* 1999;17(9-10):1017-23.

74. Levine S, Sowinski R. Carbonyl iron: a new adjuvant for experimental autoimmune diseases. *J Immunol.* 1970;105(6):1530-5.

75. Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, *et al.* Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010; 32(1):56-62.

76. Li T. Zinc hydroxide as a new vaccine adjuvant enhance the humoral immune response of HAV antigen [Master Dissertation]. Beijing: Peking Union Medical College; 2008.

77. Torvi J, Dambal SS, Indumati V. Effect of adjuvant oral zinc sulphate therapy in psoriasis patients. *Int J Med Res.* 2010;1(2): 106-10.

78. Dieter B, inventor; Behringwerke Aktiengesellschaft, assignee. Solutions containing antigen and zinc hydroxide or iron hydroxide as an adjuvant and processes for preparing such solutions. United States patent US 5252327. 1993 Oct 12.

79. Rogers RR, Garner RJ, Riddle MM, Luebke RW, Smialowicz RJ. Augmentation of murine natural killer cell activity by manganese chloride. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983;70(1):7-17.

80. Smialowicz RJ, Luebke RW, Rogers RR, Riddle MM, Rowe DG. Manganese chloride enhances natural cell-mediated immune effector cell function: Effects on macrophages. *Immunopharmacology.* 1985;9(1):1-11.

medio, el estado de oxidación, el tamaño de la partícula y la afinidad por adsorber sustancias inmunogénicas. Todas estas propiedades están directamente relacionadas con los efectos *depósito* y *presentador* atribuidos a los adyuvantes. Como consecuencia, los investigadores han rechazado sales de compuestos con potencialidades para ser mejores adyuvantes que las tradicionales sales de aluminio [92].

Las investigaciones en este campo avanzan no solo hacia la obtención de nuevos adyuvantes, sino también hacia la obtención de adyuvantes basados en los ya existentes. Con el empleo de la nanotecnología se pueden obtener sales inorgánicas a escala nanométrica que favorece la captación y adsorción por las células presentadoras de antígenos, particularmente de las células dendríticas, y que muestran nuevas propiedades, entre ellas una mayor área superficial específica que incrementa su propiedad de adsorción. El tamaño nanométrico permite mimetizar mejor la naturaleza particulada de los virus y las bacterias. Las nanopartículas de fosfato de calcio y de óxido de aluminio son un ejemplo de ello.

El estudio, la obtención y evaluación de nuevos polimorfos a partir de los compuestos conocidos y seguros de aluminio y calcio, permitirán caracterizar detalles estructurales, morfológicos y químicos que

serán la base para la reevaluación de adyuvantes ya existentes, como las sales de cinc y hierro.

Las mezclas de adyuvantes se evalúan con mayor frecuencia, de forma que se complementen sus acciones sobre el sistema inmune. La más avanzada es el adyuvante AS04. Sin embargo, las mezclas de adyuvantes inorgánicos o la síntesis de minerales artificiales con la composición química deseada para aumentar la potencia de las vacunas o reducir los efectos adversos, no se han explotado lo suficiente.

La preparación de un compuesto a partir de la combinación del hidróxido de cinc ( $Zn(OH)_2$ , promotor de patrón Th1) con las tradicionales sales de calcio y aluminio (promotor de patrón Th2) sería un buen punto de partida con el fin de obtener el adyuvante inorgánico ideal.

Por estas razones, el uso de los compuestos inorgánicos como adyuvantes continúa siendo un campo de investigación atractivo y en expansión. La aplicación de los últimos avances de la nanotecnología, junto a la combinación de adyuvantes o la preparación de compuestos nanoestructurados, integrados por sales o iones que estimulen las respuestas humoral y celular del sistema inmune por diferentes rutas de inmunización, posibilitarán la obtención de vacunas más eficaces que las actuales.

81. Smailowicz RJ, Rogers RR, Riddle MM, Luebke RW, Rowe DG, Garner RJ. Manganese chloride enhances murine cell-mediated cytotoxicity: effects on natural killer cells. *J Immunopharmacol.* 1984;6(1-2):1-23.

82. Shima S, Morita K, Tachikawa S, Ito T, Kurita H, Yoshida T, et al. IgM Antibody Production in Mice Intraperitoneally Injected with Zirconium Oxide Nanoparticles. *Br J Ind Med.* 1987;44(9):633-7.

83. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials.* 2007; 28(31):4600-7.

84. Lee JY, Atochina O, King B, Taylor L, Ellosso M, Scott P, et al. Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68(7):4032-9.

85. Hall JG. Studies on the adjuvant action of beryllium. IV. The preparation of beryllium containing macromolecules that induce immunoblast responses *in vivo*. *Immunology.* 1988;64:345-51.

86. Naim JO, van Oss CJ, Wu W, Giese RF, Nickerson PA. Mechanisms of adjuvancy: I-Metal oxides as adjuvants. *Vaccine.* 1997; 15(11):1183-93.

87. Cooper PD. Vaccine adjuvants based on gamma inulin. *Pharm Biotechnol.* 1995;6: 559-80.

88. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186-97.

89. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting Edge: Inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 2008;181(1):17-21.

90. Aucouturier J, Ganne V, Trouve G, inventors; Societe d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques, assignee. Vaccine composition of surfactants as adjuvant of immunity. United States patent US 7422748. 2008 Sep. 9.

91. Paneque A. El uso de las sales de aluminio como adyuvantes. IV International Symposium on Chemistry, 2010 Jun 1-4, Santa Clara, Cuba.

92. Paneque A. Compuestos inorgánicos como adyuvantes. 8th International Congress on Chemistry, Chemical Engineering and Biochemistry, 2012 Oct 9-12, La Habana, Cuba.

Recibido en junio de 2012.

Aprobado en abril de 2013.