



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE MEDICINA

Papel de receptores de reconocimiento de patrón que reconocen ácidos nucleicos en la respuesta inmune a vacunas

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

MÉDICO

Autor: Luzuriaga Quizhpe, Diana Isabel

Director: Rodríguez Pinto, Daniel Enrique

LOJA

2024



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2024

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Loja, 7 de mayo de 2024

Dra.

María Irene Carrillo Mayanquer

Directora de la Carrera de Medicina

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Papel de receptores de reconocimiento de patrón que reconocen ácidos nucleicos en la respuesta inmune a vacunas realizado por Diana Isabel Luzuriaga Quizhpe, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Daniel Enrique Rodríguez Pinto. Dr

C.I.: 1708251580

Correo electrónico: derodriguez22@utpl.edu.ec

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, **Diana Isabel Luzuriaga Quizhpe**, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: “Papel de receptores de reconocimiento de patrón que reconocen ácidos nucleicos en la respuesta inmune a vacunas.”, de la Titulación de Medicina, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Marco Teórico, Método de la Investigación, Resultados, Discusión, Conclusiones siendo Daniel Enrique Rodríguez Pinto, director del presente trabajo, también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autor: Diana Isabel Luzuriaga Quizhpe

C.I.: 1104924517

Correo electrónico: diluzuriaga@utpl.edu.ec

DEDICATORIA

A mi querida madre, mi abuela en el cielo y a todos los amigos que he forjado a lo largo de la carrera.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial al Dr. Daniel Rodríguez por guiar esta investigación, a cada uno de los docentes que han formado parte de mi educación, y a todas las personas que me han acompañado durante este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PREGUNTA	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
CAPÍTULO 1	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Papel del sistema inmune innato en la vacunación	5
1.2. Ácidos nucleicos como señales de peligro	5
1.3. PRRs que reconocen ácidos nucleicos	6
1.4. Estímulo a los PRRs que reconocen ácidos nucleicos por vacunas.....	9
CAPÍTULO 2.....	11
2. MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN	11
2.1. Tipo de estudio.....	11
2.2 Estrategia de Búsqueda	11
2.3. Criterios de Inclusión.....	11
2.3. Criterios de Exclusión	12
CAPÍTULO 3.....	13
3. RESULTADOS	13
3.1 . Diagrama de Flujo de Resultados.....	13
3.2. Resultados Obtenidos	14
3.3. Desarrollo de Resultados	20
5.3.1. Tabla con los Resultados de los Estudios Seleccionados..	20
3.3.2. Descripción de los artículos	28

CAPÍTULO 4	51
4. DISCUSIÓN	51
4.1. Vacunas que contienen ARN	51
4.2. Ligandos de los TLRs	52
4.3. Ligandos de PRRs citoplasmáticos	54
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. PRRs que reconocen ácidos nucleicos	7
Tabla 2. Tipos de vacunas y ejemplos	10
Tabla 3. Glosario de búsqueda.....	14
Tabla 4. Términos de búsqueda	14
Tabla 5. Ecuaciones de búsqueda y resultados	18
Tabla 6. Resultados de estudios seleccionados.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de resultados	12
--	-----------

RESUMEN

En la actualidad se ha desarrollado y probado el uso de agonistas de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), como adyuvantes en diferentes vacunas con la finalidad de estos compuestos se toleren de mejor manera, y logren inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares, imitando a la respuesta inmunitaria natural del hospedador, por lo que este estudio analizo varios adyuvantes moleculares para determinar su inmunogenicidad y eficacia en las vacunas.

Palabras claves: adyuvante, receptor de reconocimiento de patrón, vacunas.

ABSTRACT

Currently, the use of pathogen recognition receptor (PRR) agonists has been developed and tested as adjuvants in different vaccines in order to better tolerate these compounds and induce humoral and cellular immune responses, mimicking the natural immune response of the host. Therefore, this study analyzed several molecular adjuvants to determine their immunogenicity and efficacy in vaccines.

Keywords: adjuvant, pattern recognition receptor, vaccines.

INTRODUCCIÓN

La vacunación es una estrategia de prevención cuyo uso masivo ha logrado disminuir significativamente la incidencia de muchas enfermedades infecciosas. Por lo tanto, se requiere de una constante investigación que permita ampliar y mejorar la respuesta a las mismas, que le aseguren a la población una protección segura y eficaz. En este contexto el conocimiento detallado de cómo las vacunas activan el sistema inmune innato es fundamental.

Debido a la pandemia por SARS-CoV-2 se inició el uso masivo de vacunas de ácidos nucleicos para este virus y existen otras vacunas de este tipo en fases avanzadas de desarrollo. También existen muchos ligandos de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) que reconocen ácidos nucleicos que se usan como adyuvantes de nuevas vacunas. A pesar de esto, los efectos que todas estas vacunas tienen sobre estos receptores son muy complejos y poco conocidos, por lo que su revisión es importante para determinar su eficacia(1–3).

Además, la seguridad de las vacunas es una prioridad y se ha determinado que los PRRs que reconocen ácidos nucleicos pueden contribuir al desarrollo de varias enfermedades autoinmunes como lupus, diabetes tipo 1, enfermedad de Graves y psoriasis y enfermedades inflamatorias hepáticas, aterosclerosis, obesidad, gota y neurodegeneración (4,5). Por este motivo, es muy importante establecer los mecanismos responsables para lograr el uso racional y seguro de estas vacunas.

Todo lo anterior justifica esta revisión en la cual se detallarán los últimos avances en este tema.

PREGUNTA

¿Cuál es el papel de receptores de reconocimiento de patrón que reconocen ácidos nucleicos en la respuesta inmune en las vacunas?

OBJETIVO GENERAL

Revisar los últimos avances sobre los efectos celulares y moleculares de la estimulación por vacunas de los receptores de reconocimiento de patrón que reconocen ácidos nucleicos.

CAPÍTULO UNO

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Papel del sistema inmune innato en la vacunación

El objetivo de la vacunación es crear memoria inmunológica específica para el antígeno administrado con la vacuna. Esta memoria consiste en mecanismos efectores llevado a cabo por linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y anticuerpos producidos por células plasmáticas de larga vida que están disponibles de forma rápida para eliminar un microorganismo invasor que tiene el mismo antígeno administrado en la vacuna, de esta manera que los linfocitos específicos para el antígeno de la vacuna se activen de forma eficiente (6).

Es importante destacar que a su vez la activación de los linfocitos depende de las células presentadoras de antígeno (CPAs), que procesan el antígeno y lo presentan junto con moléculas co-estimuladoras, generando las señales necesarias para la activación de los linfocitos. Las células dendríticas son las CPAs más importantes y su capacidad de activar a los linfocitos depende su activación en el contexto de la inflamación generada por el sistema inmune innato. A su vez, este sistema se activa por la presencia de una señal de peligro que liga a un receptor de reconocimiento de patrón (PRRs), por lo que esta interacción es indispensable para que la vacuna genere una respuesta inmune eficaz (7).

1.2. Ácidos nucleicos como señales de peligro

Las señales de peligro que activan al sistema innato son de dos tipos: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs). Los PAMPs son moléculas propias de los microorganismos y los DAMPs son moléculas que se exponen al sistema inmune solo en condiciones de lesión tisular severa. En ambos casos su presencia alerta al sistema inmune innato

que debe activarse. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) son reconocidos como importantes señales de peligro en diversas respuestas inmunes (5).

En primer lugar, los ácidos nucleicos de virus, bacterias y protozoarios pueden desencadenar respuestas inmunes. Por ejemplo, ARN viral de doble cadena, ARN de cadena simple, ARN de una cadena con extremo 5' trifosfato, secuencias de ADN CpG no metiladas. También pueden generarse ácidos nucleicos como DAMPs en condiciones de lesión tisular, como por ejemplo el ARN mitocondrial oxidado (8).

1.3. PRRs que reconocen ácidos nucleicos

Los PRRs son receptores específicos que tienen como función el reconocimiento de los PAMPs y los DAMPs. Existen una gran cantidad de PRRs, su expresión en las células del organismo es muy amplia y cada uno reconoce varios ligandos. Un grupo importante es el que reconoce a los ácidos nucleicos, ya que la detección de ácidos nucleicos con estructuras o secuencias anormales en un agente peligroso inicia la respuesta inmune requerida. En los últimos años se han descrito muchos PRRs de este grupo, siendo los más importantes los que pertenecen a las familias de receptores Toll-like (TLR), RIG-like, NOD-like y nucleotidiltransferasas (Tabla 1) (9,10).

La familia TLR se puede dividir en subfamilias entre lo que tenemos TLRs 3, 7, 8 y 9, que se expresen principalmente en la membrana de endosomas. El receptor TLR3 reconoce ARN viral de doble cadena, ARNs que son intermediarios de virus que tienen ADN, ARN de células estresadas o necróticas que tienen estructuras secundarias con un tallo parcial, y el análogo sintético del ARN de doble cadena poly (I:C). El receptor TLR7 es capaz de reconocer ARN viral de una cadena rico en G y U presentes en el ARN de hongos, y derivados de imidazoquinolina (imiquimod y

resiquimod). El receptor TLR8 se encarga del reconocimiento de ARN viral de una cadena rico en A y U, y derivados de imidazoquinolina (imiquimod y resiquimod). El receptor TLR9 identifica secuencias CpG no metiladas de ADN de microorganismos (2,9).

Mientras que los receptores de la familia RIG-like se encuentran presentes en el citosol celular, entre los que tenemos RIG-1, MDA5, LGP2 y se encargan de reconocer el ARN, el receptor RIG-I reconoce ARN de doble cadena de menos de 1000 pares de bases y ARN de una cadena con extremo 5' di o trifosfato. El receptor MDA5 identifica el ARN de doble cadena de más de 1000 pares de bases y el análogo sintético del ARN de doble cadena poly (I:C) (10).

El receptor Sintasa de GMP cíclico (cGAS) presente en el citosol celular se encarga del reconocimiento de ADN derivado de patógenos y ADN derivado de ARN viral por retrotranscripción (11).

En tanto que la familia NOD-like se localiza en el citosol; entre estos podemos mencionar a: NLRP3, AIM2, IFI16 encargados de reconocer ADN. Específicamente el receptor NLRP3 reconoce ADN mitocondrial oxidado que llega al citosol, el receptor AIM2 e IFI16 identifica el ADN derivado de bacterias que se lisan y llega al citoplasma, ADN de virus y ADN propio de células infectadas por virus (12).

Tabla 1. PRRs que reconocen ácidos nucleicos

Familias	Receptor	Ubicación	Ligandos
Toll-like (TLR)	TLR 3	Endosomas	ARN viral de doble cadena
	TLR 7		ARN viral de una cadena rico en G y U
	TLR 8		ARN viral de una cadena rico en A y U

	TLR 9		Secuencias CpG no metiladas de ADN
RIG-like	RIG-1	Citosol	ARN de doble cadena de menos de 1000 pares de bases
	MDA5		
Nucleotidiltransferasas	Sintasa de GMP cíclico (cGAS)	Citosol	ADN derivado de patógenos
NOD-like	NLRP3	Citosol	ADN mitocondrial oxidado
	AIM2		ADN derivado de bacterias que se lisan
	IFI16		

Nota: 9,10,12

Cabe notar que estos PRRs se expresan en todos los tipos de células del sistema inmune innato, especialmente células dendríticas y monocito-macrófago. Hay alta expresión de TLRs en células dendríticas plasmacitoides que secretan interferones tipo I y también pueden expresarse en fibroblastos y células epiteliales. Adicionalmente, los TLRs 7 y 9 se expresan en linfocitos B y los receptores de la familia RIG-I-like tienen expresión en todas las células del organismo (8,10).

Los PRRs activan diversas vías de señalización que conducen a la activación de la respuesta inflamatoria y de las células dendríticas. Por ejemplo, los TLRs actúan a través de la vía MyD88, cGAS a través de la proteína STING, y los receptores de la familia NOD-like activan el inflamosoma. Estas vías conducen a la activación de diversos factores de transcripción, como NF- κ B y factores de respuesta a interferón (IRFs), secreción de citocinas proinflamatorias, interferones tipo I, expresión de MHC y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Además, el inflamosoma induce maduración de IL-1 β e IL-18 y se ha determinado que la señal por TLR7 promueve diferenciación de linfocitos TCD4 a Th17, mientras que los TLRs 8 y 9 promueven diferenciación a Th1 (8,9,13,14).

1.4. Estímulo a los PRRs que reconocen ácidos nucleicos por vacunas

Como se mencionó anteriormente, toda vacuna debe estimular a los PRRs para iniciar la respuesta inmune. Por esto, la administración del antígeno de interés siempre debe estar acompañado de una señal de peligro. En algunas vacunas en las que se administra el microorganismo completo, los PAMPs de este microorganismo son la señal de peligro. En cambio, las vacunas que son un antígeno purificado deben incluir otro elemento que proporcione esta señal de peligro, al cual le denominamos adyuvante. De esta forma hay 3 maneras en la que las vacunas pueden estimular a los PRRs que reconocen ácidos nucleicos: 1) vacunas de microorganismos completos contienen ácidos nucleicos; 2) vacunas que usan ligandos de PRRs que reconocen ácidos nucleicos como adyuvantes; y 3) vacunas que usan ARNm o ADN como medios para administración de antígenos (3,12,15).

Para el primer caso existen muchas vacunas de virus atenuados o inactivados que contienen los ácidos nucleicos virales que estimulan los PRRs y esto ayuda a generar una respuesta inmune eficiente. Entre estas tenemos las vacunas de la polio, fiebre amarilla, varicela, SRP (sarampión, rubeola, paperas). Además, vacunas basadas en cepas atenuadas de bacterias también puede estimular estos receptores, siendo el ejemplo más importante la BCG (16).

En cuanto a los adyuvantes que estimulan los receptores de los PRRs que reconocen ácidos nucleicos, existen una gran diversidad la mayoría de los cuales están en fase de investigación para su uso en nuevas vacunas o mejorar la eficiencia de las que existen. Estos incluyen varios ácidos nucleicos de origen microbiano o sintéticos, así como otros compuestos de diferente naturaleza química, como nucleótidos cíclicos e imidazoquinolinas (15,17). La descripción de varios de estos adyuvantes será el tema de esta revisión.

Por último, hay vacunas en la que secuencia del antígeno de interés esta codificada en ácidos nucleicos, ADN o ARNm. Esta estrategia se desarrolló ya que proporciona ventajas en cuanto a la fabricación, ventajas y seguridad de la vacuna. Sin embargo, estos ácidos nucleicos también pueden estimular los PRRs y así cumplir la función de adyuvante. El ejemplo más relevante son vacunas para SARS-Cov2 que contiene ácidos nucleicos que codician la proteína Spike, que se están usando masivamente desde la pandemia. Existen otras vacunas de este tipo en fase de desarrollo, especialmente para el VIH (3,18,19).

Tabla 2. Tipos de vacunas y ejemplos

Tipo de vacunas	Mecanismo del estímulo	Ejemplos
Microorganismo completo	Ácido nucleico del microorganismo	Polio, fiebre amarilla, varicela, SRP
Adición de adyuvante	Adición de ligando de PRRs a la vacuna	Malaria, tuberculosis, VIH, hepatitis.
ARN o ADN	Ácido nucleico codifica el antígeno y se une a PRRs	Sars-Cov 2, VIH.

Nota: 16,17,19

CAPÍTULO DOS

2. MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Tipo de estudio

Revisión bibliográfica narrativa

2.2 Estrategia de Búsqueda

Se procedió a realizar la búsqueda de descriptores DeCS en la biblioteca virtual de Salud (BVS) y los de descriptores MeSH en la National Library of Medicine (NHI)

Para el desarrollo de la búsqueda en la se aplicó la terminología MeSh y la siguiente ecuación de búsqueda: (("mrna vaccine"[Supplementary Concept] OR "mrna vaccine"[All Fields] OR "mrna vaccine"[All Fields]) AND ("immunity"[MeSH Terms] OR "immunity"[All Fields] OR ("immune"[All Fields] AND "response"[All Fields]) OR "immune response"[All Fields])) AND ((y_10[Filter]) AND (ffrft[Filter]) AND (english[Filter])) y se usaron filtros como: Texto completo, publicación en los últimos 5 años, artículos en inglés

En el portal regional BVS se aplicó la siguiente ecuación de búsqueda: (adaptive immunity) AND (pattern recognition receptors) AND (adjuvants) AND (fulltext:("1" OR "1" OR "1") AND db:("MEDLINE") AND mj:("Receptores de Reconocimiento de Patrones") AND la:("en")) AND (year_cluster:[2017 TO 2022]) y se aplicaron filtros como: Texto completo, publicación en los últimos 5 años y artículos en inglés

2.3. Criterios de Inclusión

- Ensayos clínicos, ensayos clínicos aleatorizados, estudios de cohorte, estudios de ciencia básica.
- Artículos en inglés o español.

- Artículos con texto completo.
- Artículos de los últimos 5 años.
- Artículos que cumplan con los objetivos del estudio.

2.3. Criterios de Exclusión

- Artículos que no mantengan relación con los objetivos planteados.
- Artículos repetidos en otras bases de datos.

CAPÍTULO TRES

3. RESULTADOS

3.1. Diagrama de Flujo de Resultados

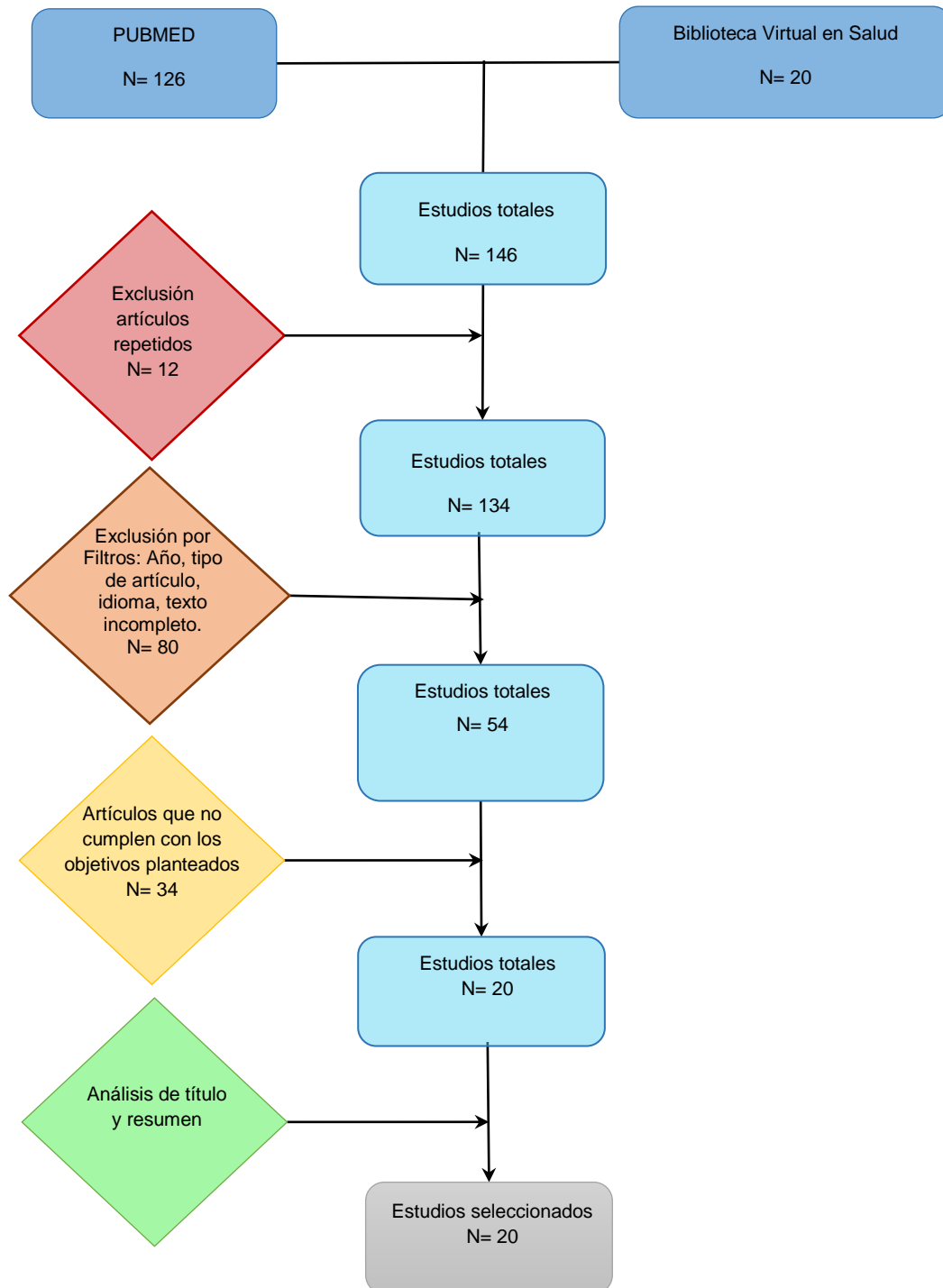


Figura 1. Diagrama de flujo de resultados

3.2. Resultados Obtenidos

Tabla 3. Glosario de búsqueda

ESPAÑOL	INGLES
Patrones de reconocimiento de receptores	Pattern recognition receptors
Vacunas de ADN	DNA vaccine
Vacunas de mRNA	mRNA vaccine
Sistema inmune adaptativo	Adaptive immunity
Adyuvantes combinados	Combination Adjuvants
Adyuvantes	Adjuvants
Vacunas de ácidos nucleicos	Nucleic acid vaccines
Respuesta inmune	Immune Response
Receptores Toll-like (TLR)	Toll-Like Receptors
Receptores RIG-like	RIG-like Receptors
Receptores NOD-like	NOD-like Receptors

Tabla 4. Términos de búsqueda

VARIABLE	DEC'S	SINÓNIMOS	MESH'S	SYNONYMS
Adaptive immunity	Inmunidad adaptativa Animales	Inmunidad específica	Adaptive Immunity Animals	Specific immunity

	<p>Vacuna BNT162 Linfocitos T CD8 positivos*. Humanos Inmunidad innata Ratones Vacunas Vacunas sintéticas Vacunas de ARNm</p>		<p>BNT162 Vaccine CD8-Positive T- Lymphocytes* Humans Immunity, Innate Mice Vaccines* Vaccines, Synthetic mRNA Vaccines</p>	
<p>Combination Adjuvants</p>	<p>Adyuvantes</p>	<p>Adyuvantes Inmunológicos</p>	<p>Adaptive Immunity / immunology Adjuvants, Immunologic / pharmacology* Animals Antibodies, Neutralizing / blood Antibodies, Neutralizing / immunology</p>	<p>Immunological Adjuvants</p>

			Antibodies, Viral / blood Antibodies, Viral / immunology* COVID-19 / prevention & control* COVID-19 Vaccines / immunology* Chlorocebus aethiops Cross Protection / immunology DEAD Box Protein 58 HEK293 Cells Humans Immunity, Humoral / immunology Immunization, Passive Mice Mice, Inbred C57BL	
--	--	--	---	--

			Receptors, Immunologic / agonists Recombinant Proteins / immunology SARS-CoV-2 / immunology* Spike Glycoprotein, Coronavirus / immunology Vaccination Vaccines, Synthetic / immunology*	
Pattern recognition receptors	Aminoácidos, péptidos y proteínas Proteínas Proteínas de membrana Receptores de superficie celular	Receptores inmunológicos Receptores de superficie celular	Amino Acids, Peptides, and Proteins Proteins Membrane Proteins Receptors, Cell Surface Receptors, Immunologic	Immunological receptors Cell surface receptors

	Receptores de reconocimiento de patrones Receptores Toll-Like		Receptors, Pattern Recognition Toll-Like Receptors	
--	--	--	---	--

Tabla 5. Ecuaciones de búsqueda y resultados

Motor de búsqueda/Bases de datos	Descriptores y operadores booleanos (Ecuación de búsqueda)	Limitadores	Número de artículos encontrados
PubMed/MEDLINE	((("mrna vaccine"[Supplementary Concept] OR "mrna vaccine"[All Fields] OR "mrna vaccine"[All Fields]) AND ("immunity"[MeSH Terms] OR "immunity"[All Fields] OR ("immune"[All Fields] AND "response"[All Fields]) OR "immune response"[All Fields])) AND ((y_10[Filter]) AND (ffrft[Filter]) AND (english[Filter]))	Texto completo gratuito , Últimos 5 años, inglés,	28
	(("adjuvancy"[All Fields] OR "adjuvanted"[All Fields] OR "adjuvanting"[All Fields] OR "adjuvants"[All Fields] OR "adjuvants pharmaceutical"[Pharmacological Action] OR "adjuvants immunologic"[Pharmacological Action] OR "adjuvants, pharmaceutical"[MeSH Terms] OR ("adjuvants"[All Fields] AND "pharmaceutical"[All Fields]) OR "pharmaceutical adjuvants"[All Fields] OR "adjuvant"[All Fields] OR "adjuvants, immunologic"[MeSH Terms] OR ("adjuvants"[All Fields] AND "immunologic"[All Fields]) OR "immunologic adjuvants"[All Fields] OR "adjuvated"[All	Texto completo gratuito Revistas , Últimos 5 años, inglés,	16

	<p>Fields] OR "adjuvation"[All Fields] OR "adjuvent"[All Fields]) AND ("nucleic acid based vaccines"[MeSH Terms] OR ("nucleic"[All Fields] AND "acid based"[All Fields] AND "vaccines"[All Fields]) OR "nucleic acid based vaccines"[All Fields] OR ("nucleic"[All Fields] AND "acid"[All Fields] AND "vaccines"[All Fields]) OR "nucleic acid vaccines"[All Fields]) AND ("receptors, pattern recognition"[MeSH Terms] OR ("receptors"[All Fields] AND "pattern"[All Fields] AND "recognition"[All Fields]) OR "pattern recognition receptors"[All Fields] OR ("pattern"[All Fields] AND "recognition"[All Fields] AND "receptors"[All Fields]))) AND ((y_5[Filter]) AND (ffrft[Filter]))</p>		
	<p>((("vaccin"[Supplementary Concept] OR "vaccin"[All Fields] OR "vaccination"[MeSH Terms] OR "vaccination"[All Fields] OR "vaccinable"[All Fields] OR "vaccinal"[All Fields] OR "vaccinate"[All Fields] OR "vaccinated"[All Fields] OR "vaccinates"[All Fields] OR "vaccinating"[All Fields] OR "vaccinations"[All Fields] OR "vaccination s"[All Fields] OR "vaccinator"[All Fields] OR "vaccinators"[All Fields] OR "vaccine s"[All Fields] OR "vaccined"[All Fields] OR "vaccines"[MeSH Terms] OR "vaccines"[All Fields] OR "vaccine"[All Fields] OR "vaccins"[All Fields]) AND ("receptors, pattern recognition"[MeSH Terms] OR ("receptors"[All Fields] AND "pattern"[All Fields] AND "recognition"[All Fields]) OR "pattern recognition receptors"[All Fields] OR ("pattern"[All Fields] AND "recognition"[All Fields] AND "receptors"[All Fields])) AND ("adaptive immunity"[MeSH Terms] OR ("adaptive"[All Fields] AND "immunity"[All Fields]) OR "adaptive immunity"[All Fields])) AND ((y_5[Filter]) AND (ffrft[Filter]) AND (clinicaltrial[Filter]))</p>	<p>Texto completo gratuito Ensayo clínico, Últimos 5 años, inglés,</p>	<p>5</p>

BVS	(adaptive immunity) AND (pattern recognition receptors) AND (adjuvants) AND (fulltext:"1" OR "1") AND mj:("Receptores de Reconocimiento de Patrones") AND la:("en")) AND (year_cluster:[2017 TO 2022])	Texto completo, inglés, MEDLINE, gratis, últimos 5 años	4
-----	--	---	---

3.3. Desarrollo de Resultados

5.3.1. Tabla con los Resultados de los Estudios Seleccionados

Tabla 6. Resultados de estudios seleccionados

Autores	País/año	Título	Tipo de estudio	Objetivo	Conclusiones
Jangra, S., Landers, J. J., Rathnasinghe, R., O'Konek, J. J., Janczak, K. W., Cascalho, M., Kennedy, A. A., Tai, A. W., Baker, J. R., Schotsaert, M., & Wong, P. T.	Estados Unidos, 2021	Un adyuvante combinado para la inducción de respuestas inmunes antivirales potentes para una vacuna de proteína recombinante para SARS-CoV-2	Estudio experimental	Establecer la respuesta inmunológica de la combinación de la vacuna contra SARS-CoV-2 con el adyuvante intranasal IVT-DI	El uso del adyuvante intranasal diseñado por nanoemulsión (NE) activa TLRs y NLRP3 mediante un ARN agonista de RIG-I (IVT DI). La combinación del adyuvante con el antígeno provocó respuestas eficientes contra SARS-CoV-2 en ratones inmunizados con esta vacuna, obteniendo una respuesta celular TH1 marcada y títulos elevados de anticuerpos.

Wong, P. T., Goff, P. H., Sun, R. J., Ruge, M. J., Ermler, M. E., Sebring, A., O'Konek, J. J., Landers, J. J., Janczak, K. W., Sun, W., & Baker, J. R.	Estados Unidos, 2021	Adyuvantes combinados de nanoemulsión intranasal y ARN activador de RIG-I realzan la inmunidad mucosa, humoral y celular al virus de la influenza	Estudio experimental	Determinar si la combinación de dos adyuvantes distintos NE y RIG-I basados en ARN mejoran la inmunogenicidad y la amplitud de la protección contra el virus de la gripe.	Los adyuvantes combinados de NE/ARN permitieron la coestimulación de múltiples vías de receptores inmunitarios innatos, imitando los patrones de activación durante una infección vírica natural, demostrando que las combinaciones de adyuvantes actúan de manera sinérgica.
Atalis, A., Keenum, M. C., Pandey, B., Beach, A., Pradhan, P., Vantucci, C., O'Farrell, L., Noel, R., Jain, R., Hosten, J., Smith, C., Kramer, L., Jimenez, A., Ochoa, M. A., Frey, D., & Roy, K.	Estados Unidos, 2022	Agonistas de TLR4 y RIG-I entregados por nanopartículas realzan la respuesta inmune a una vacuna de subunidad para SARS-CoV-2	Estudio experimental	Comprobar que el uso de adyuvantes moleculares en combinación con un antígeno proteínico en espiga podría ayudar a prevenir la infección, mientras que la combinación con un antígeno proteico estabilizado podría estimular respuestas inmunitarias más eficientes.	Las vacunas en combinación con adyuvantes moleculares dirigidos a TLR4 y RIG-I dan lugar a respuestas inmunitarias adaptativas sólidas y específicas contra el SARS-CoV-2.
Khan, A., Singh, V. K., Mishra, A., Soudani, E., Bakhru, P., Singh, C. R., Zhang, D., Canaday, D. H., Sheri, A., Padmanabhan, S., Challa, S., Iyer, R. P., & Jagannath, C.	Estados Unidos, 2020	El adyuvante activador de NOD2/RIG-I inarigivir realza la eficacia de la vacuna BCG contra la tuberculosis en ratones	Estudio experimental	Aumentar la potencia de la vacuna Bacille Calmette-Guérin (BCG) mediante la adición de adyuvantes agonistas de RIG-I y NOD2.	Inarigivir es un agonista de RIG-I y NOD2 que muestra actividad antivírica contra la hepatitis B y C, norovirus, VSR, la gripe y la parainfluenza
Turley, J. L., Moran, H. B. T., McEntee, C. P., O'Grady, K., Muñoz-Wolf, N., Jin, L., Follmann, F.,	Multinacional, 2021	La de-acetilación del polímero derivado de quitina regula la activación de cGAS-STING y el inflamosoma NLRP3	Estudio experimental	Comprender los mecanismos moleculares de la vacuna ARNm BNT162b2 mediante su administración en ratones.	La inmunización de ARNm BNT162b2 estimuló una respuesta potente de células T específicas de antígeno, además, mejoro la respuesta

Andersen, P., Andersson, M., & Lavelle, E. C.		dependiente de especies reactivas del oxígeno			innata del hospedador y aumento los niveles séricos de interferón (IFN)- γ 1
Tahtinen, S., Tong, A.-J., Himmels, P., Oh, J., Paler-Martinez, A., Kim, L., Wichner, S., Oei, Y., McCarron, M. J., Freund, E. C., Amir, Z. A., de la Cruz, C. C., Haley, B., Blanchette, C., Schartner, J. M., Ye, W., Yadav, M., Sahin, U., Delamarre, L., & Mellman, I.	Multinacional, 2022	IL-1 y IL-1ra son reguladores clave de la respuesta inflamatoria a vacunas de ARN	Estudio experimental	Analizar las respuestas inflamatorias tras la administración de vacunas de ARN.	Las vacunas de ARN inducen la fabricación de citocinas IL-1, sobre todo IL-1 β , que depende de la formulación de ARN y de lípidos.
Li, C., Lee, A., Grigoryan, L., Arunachalam, P. S., Scott, M. K. D., Trisal, M., Wimmers, F., Sanyal, M., Weidenbacher, P. A., Feng, Y., Adamska, J. Z., Valore, E., Wang, Y., Verma, R., Reis, N., Dunham, D., O'Hara, R., Park, H., Luo, W., ... Pulendran, B	Estados Unidos, 2022	Mecanismos de inmunidad innata y adaptativa a la vacuna BNT162b2 de Pfizer-BioNTech	Estudio experimental	Reconocer la eficacia del Quitosan como adyuvante polisacárido catiónico.	Tras su uso se evidencio que este potencia la respuesta de los anticuerpos y la inmunidad celular ya sea por vía muscular o mucoso.
Gutjahr, A., Papagno, L., Nicoli, F., Kanuma, T., Kuse, N., Cabral-Piccin, M. P., Rochereau, N., Gostick, E., Lioux, T., Perouzel, E., Price, D. A., Takiguchi, M., Verrier, B.,	Multinacional, 2019	El ligando de STING cGAMP potencia la eficacia de los linfocitos T CD8+ inducidos por vacunas	Estudio experimental	Valorar la eficacia del guanosín monofosfato-adenosín monofosfato cíclico (cGAMP) como adyuvante en las vacunas.	El uso de cGAMP indujo respuestas antitumorales y antivirales de TCD8, demostrando su efectividad.

Yamamoto, T., Paul, S., & Appay, V.					
Gutjahr, A., Papagno, L., Vernejoul, F., Lioux, T., Jospin, F., Chanut, B., Perouzel, E., Rochereau, N., Appay, V., Verrier, B., & Paul, S.	Francia, 2020	Un nuevo agonista quimérico de TLR7/NOD2 es un adyuvante potente para inducir respuestas inmunes en las mucosas	Estudio experimental	Evaluar el agonista combinado TLR7/NOD2 la respuesta inmunológica al uso este compuesto químico híbrido.	El agonista TLR7/NOD2L induce la inmunidad sistémica y de las mucosas, además se puede usar en diferentes tipos de vacunas.
Chang, X., Krenger, P., Krueger, C. C., Zha, L., Han, J., Yermanos, A., Roongta, S., Mohsen, M. O., Oxenius, A., Vogel, M., & Bachmann, M. F.	Suiza, 2022	La señalización por TLR7 da forma y mantiene a la diversidad de anticuerpos luego de inmunización con partículas similares a virus	Estudio experimental	Reconocer el mecanismo inmunológico de receptores innatos de reconocimiento de patrones TLR7/ TLR8 usados en diferentes vacunas.	Tras la inmunización se demostró que el uso de estos PRRs aumenta los niveles anticuerpos especialmente de IgG,
Noh, K., Jeong, E. J., An, T., Shin, J. S., Kim, H., Han, S. B., & Kim, M.	Corea del Sur, 2022	Eficacia de un compuesto 2,4-diaminoquinazolina como adyuvante de vacunas intranasales para proteger contra infección por virus de la influenza A <i>in vivo</i>	Estudio experimental	Analizar los efectos del compuesto 31 a base de 2,4-diaminoquinazolina	El compuesto 31 provocó la producción de citocinas, aumentó la obtención de IgG e IgA y neutralizó el virus de la gripe A
Kasturi, S. P., Rasheed, M. A. U., Havenar-Daughton, C., Pham, M., Legere, T., Sher, Z. J., Kovalenkov, Y., Gumber, S., Huang, J. Y., Gottardo, R., Fulp, W., Sato, A., Sawant, S., Stanfield-Oakley, S., Yates, N., LaBranche, C., Alam, S. M., Tomaras, G., Ferrari, G., ... Pulendran, B.	Estados Unidos, 2020	3M-052, un agonista sintético de TLR-7/8, induce células plasmáticas e inmunidad humoral específicas para la envoltura del HIV-1 durables en primates no humanos	Estudio experimental	Demostrar la eficacia de 3M-052 para promover respuestas inmunitarias.	Se demuestro la eficacia de 3M-052ya que estimulo los anticuerpos de alta afinidad, potenciando la respuesta inmune.

Gonzalez-Lopez, A., Oostendorp, J., Koernicke, T., Fadini, T., D'Oro, U., Baker, S., O'Hagan, D. T., Del Giudice, G., Siena, E., Finco, O., & Medini, D.	Estados Unidos, 2019	Efecto adyuvante de un agonista de TLR7 adsorbido a hidróxido de aluminio (AS37): un estudio de escalación de dosis, aleatorizado, de fase I de una vacuna conjugada para el meningococo C adyuvantada con AS37	Estudio experimental	Evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una vacuna conjugada contra el meningococo C con el adyuvante AS37	Las serorespuestas ELISA fueron $\geq 81\%$ para las vacunas adyuvada con AS37, y las respuestas de estas, se mantuvieron luego de seis meses tras la vacunación.
Counoupas, C., Pino, P., Stella, A. O., Ashley, C., Lukeman, H., Bhattacharyya, N. D., Tada, T., Anchisi, S., Metayer, C., Martinis, J., Aggarwal, A., Dcosta, B. M., Britton, W. J., Kint, J., Wurm, M. J., Landau, N. R., Steain, M., Turville, S. G., Wurm, F. M., ... Triccas, J. A.	Australia, 2022	Alto título de anticuerpos neutralizantes contra la variante delta del SARS-CoV-2 inducido por antígenos Spike triméricos adyuvantados con Alhydroxyquim-II	Estudio experimental	Explicar el efecto de una vacuna contra SARS-CoV- 2 adyuvada con el compuesto Alhydroxyquim-II	Esta vacuna es efectiva contra múltiples variantes del SARS-CoV-2; especialmente contra la variante Delta.
Kasturi, S. P., Rasheed, M. A. U., Havenar-Daughton, C., Pham, M., Legere, T., Sher, Z. J., Kovalenkov, Y., Gumber, S., Huang, J. Y., Gottardo, R., Fulp, W., Sato, A., Sawant, S., Stanfield-Oakley, S., Yates, N., LaBranche, C., Alam, S. M., Tomaras, G., Ferrari, G., ... Pulendran, B.	Estados Unidos, 2020	3M-052, un agonista sintético de TLR-7/8, induce células plasmáticas e inmunidad humoral específicas para la envoltura del HIV-1 durables en primates no humanos	Estudio experimental	Demostrar la eficacia de 3M-052 para promover respuestas inmunitarias.	Se demuestró la eficacia de 3M-052 ya que estimuló los anticuerpos de alta afinidad, potenciando la respuesta inmune.

Gonzalez-Lopez, A., Oostendorp, J., Koernicke, T., Fadini, T., D'Oro, U., Baker, S., O'Hagan, D. T., Del Giudice, G., Siena, E., Finco, O., & Medini, D.	Estados Unidos, 2019	Efecto adyuvante de un agonista de TLR7 adsorbido a hidróxido de aluminio (AS37): un estudio de escalación de dosis, aleatorizado, de fase I de una vacuna conjugada para el meningococo C adyuvantada con AS37	Estudio experimental	Evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una vacuna conjugada contra el meningococo C con el adyuvante AS37	Las serorespuestas ELISA fueron $\geq 81\%$ para las vacunas adyuvada con AS37, y las respuestas de estas, se mantuvieron luego de seis meses tras la vacunación.
Counoupas, C., Pino, P., Stella, A. O., Ashley, C., Lukeman, H., Bhattacharyya, N. D., Tada, T., Anchisi, S., Metayer, C., Martinis, J., Aggarwal, A., Dcosta, B. M., Britton, W. J., Kint, J., Wurm, M. J., Landau, N. R., Steain, M., Turville, S. G., Wurm, F. M., ... Triccas, J. A.	Australia, 2022	Alto título de anticuerpos neutralizantes contra la variante delta del SARS-CoV-2 inducido por antígenos Spike triméricos adyuvantados con Alhydroxyquim-II	Estudio experimental	Explicar el efecto de una vacuna contra SARS-CoV-2 adyuvada con el compuesto Alhydroxyquim-II	Esta vacuna es efectiva contra múltiples variantes del SARS-CoV-2; especialmente contra la variante Delta.
Zhang, R.-Y., Zhou, S.-H., He, C.-B., Wang, J., Wen, Y., Feng, R.-R., Yin, X.-G., Yang, G.-F., & Guo, J.	China, 2022	Una vacuna conjugada adyuvante-proteína con un agonista de TLR7 incorporado a S1 induce inmunidad potente contra el SARS-CoV-2 y variantes relevantes	Estudio experimental	Experimentar el efecto del agonista de TLR7 (TLR7a) conjugado con la subunidad S1 de la espiga de SARS-CoV-2.	Desencadenó inmunidad humoral y celular y una respuesta inmunitaria Th1/Th2 equilibrada.
Ganneru, B., Jogdand, H., Daram, V. K., Das, D., Molugu, N. R., Prasad, S. D., Kannappa, S. V., Ella, K. M., Ravikrishnan, R.,	India, 2021	Respuesta inmune sesgada a Th1 de una vacuna de virión completo inactivado para SARS-CoV-2 y su evaluación de seguridad	Estudio experimental	Evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna BBV152) contra el SARS-CoV-2, adyuvada con	Los resultados muestran que BBV152 genera aumento de anticuerpos neutralizantes y de unión al antígeno (NAb), en

Awasthi, A., Jose, J., Rao, P., Kumar, D., Ella, R., Abraham, P., Yadav, P. D., Sapkal, G. N., Shete-Aich, A., Desphande, G., ... Vadrevu, K. M.				hidróxido de aluminio o con un agonista TLR7/8.	ambas concentraciones usadas.
Nouri-Shirazi, M., & Guinet, E.	Estados Unidos, 2022	Agonistas de TLR3 y TLR7/8 mejoran el resultado de la inmunización en ratones expuestos a nicotina por mecanismos distintos	Estudio experimental	Evaluar la a dimensión y el mecanismo inmunitario de un antígeno proteico formulado con nicotina y adyuvado con Poly(I:C) y R848	En este estudio se afirma la hipersensibilidad de los fumadores a las vacunas.

Dasari, V., Beckett, K., Horsefield, S., Ambalathingal, G., & Khanna, R.	Australia, 2022	Una vacuna bivalente para CMV formulada con el agonista de TLR9 compatible con humano CpG1018 induce inmunidad humoral y celular potente en ratones que expresan HLA	Estudio experimental	Evaluar la respuesta de una vacuna bivalente de glicoproteína B (gB) oligomérica codificada por CMV y proteína poliepitópica en mezcla con TLR.	Esta vacuna forma anticuerpos antivirales persistentes y una respuesta de T CD4+ y CD8+ específica de CMV con expresión HLA.
Lu, W., Cui, C., Wang, Y., Sun, X., Wang, S., Yang, M., Yu, Y., & Wang, L.	China, 2021	El ODN CpG como adyuvante realza el vigor de los linfocitos B al bloquear la regulación negativa del TLR9 de superficie para aumentar la respuesta de anticuerpos a vacunas	Estudio experimental	Describir el efecto de la vacuna de la hepatitis B adyuvada con CpG-5805.	CpG-5805 potencia la respuesta de anticuerpos a la vacuna y disminuye la cantidad de sTLR9 en los linfocitos B.
Yamamoto, T., Masuta, Y., Momota, M., Kanekiyo, M., Kanuma, T., Takahama, S., Moriishi, E., Yasutomi, Y., Saito, T., Graham, B. S., Takahashi, Y., & Ishii, K. J.	Japón, 2019	Un peculiar agonista nanoparticulado del TLR9 confiere a la vacuna dividida de HA conferir protección mediada por FcR contra la infección letal heteróloga por virus de la influenza	Estudio experimental	Identificar los efectos inmunológicos de la vacuna HA K3-SPG, contra el virus de la influenza	HA K3-SPG provocó aumento anticuerpos especialmente IgG y T CD8, sin evidenciar efectos de reacción cruzada.

3.3.2. Descripción de los artículos

Un adyuvante combinado para la inducción de respuestas inmunes antivirales potentes para una vacuna de proteína recombinante para SARS-CoV-2 (20).

Las vacunas usadas contra SARs-CoV-2 autorizadas en la actualidad dejan muchas dudas ya que no se conoce la duración de la inmunidad ni la amplitud de la protección conferida por las mismas. Esto se puede explicar entiendo la función de los adyuvantes, esenciales para la protección a largo plazo.

Por lo que se desarrolló un adyuvante basado en nanoemulsión (NE) que activa TLR y NLRP3 junto con un agonista de ARN de RIG-I (IVT DI). NE se compone de la emulsión de aceite de soja en agua, un surfactante no iónico (Tween80) y uno catiónico (cloruro de cetilpiridinio) y etanol.

Se inmunizó a ratones (IM o IN), mostrando mínimos efectos inflamatorios, los mismos fueron evaluados midiendo los niveles séricos de citoquinas (IL-6, TNF- α , IL12p70, y IFN- γ) después de 6 a 12 horas de la aplicación de 10 μ g del dominio de unión al receptor (RBD) del antígeno Spike de SARS-CoV-2 solo o combinado con el adyuvante NE (25% w/v) o NE/IVT (20% NE/0.5 mg IVT DI, en un volumen total de 12 μ L). Se observó una mínima elevación de IL-6 tanto con adyuvante, como sin este, mientras que las demás citoquinas eran indetectables, evidenciando así el perfil de seguridad de este.

Mientras que para medir la respuesta humoral inducida por NE/IVT se usó 3 dosis de la subunidad S1 del SARS-CoV-2, como antígeno para la inmunización. Dos semanas después de cada inmunización se midió los niveles de IgM, observándose que esta aumentó significativamente en los grupos en los que se usó el ayudante en

comparación con los que no se usó en las que solo aumento ligeramente; se obtuvieron resultados similares con IgA, a diferencia que el grupo NE/S1 fue ligeramente más alto en comparación con NE/IVT/S1.

Para examinar la capacidad de neutralización de los anticuerpos de ratones inmunizados se utilizó WT SARS-CoV-2, una variante con mutaciones en la proteína S, resultando que los valores de anticuerpos neutralizantes son significativamente más bajos en los ratones inmunizados con S1, que en los ratones inmunizados con el adyuvante combinado.

Finalmente, se evaluó la respuesta de las células T de los esplenocitos y de las de células aisladas del nódulo linfático cervical a la estimulación de S1 y de los adyuvantes durante 72 horas, para posteriormente medir los valores de citocinas obteniendo que la producción de IFN-g, IL-2, IP-10 y TNF-a, aumentaron significativamente con la estimulación de NE/IVT en comparación con el grupo NE. Este aumento de las citocinas asociadas a Th1 y al TNF-a es significativo, ya que se ha demostrado que la coproducción de IFN-g, IL-2 y TNF-a en las células T polifuncionales específicas es el criterio más fuerte para predecir la protección mediada por las células inducidas por la vacuna.

En el análisis de las citoquinas asociadas a Th2 no se observó una elevación significativa de la IL-4 en ninguno de los grupos de tratamiento, y sólo se observaron niveles mínimos de IL-13 con NE o NE/IVT que fueron equivalentes a los inducidos por el antígeno solo.

Adyuvantes combinados de nanoemulsión intranasal y ARN activador de RIG-I realzan la inmunidad mucosa, humoral y celular al virus de la influenza (21).

En el presente estudio se combinaron dos adyuvantes: una nano emulsión (NE) y un ARN agonista del receptor RIG-I. La NE se produjo por emulsión de cloruro de cetilpiridinio (CPC) y Tween 80, etanol (200 proof), aceite de soja (Croda) y agua purificada utilizando flujo de alta velocidad, mientras que se utilizaron tres tipos de ARN: IVT DI, 3php, y pIC. Los dos primeros son derivados de virus y el tercero es un ligando sintético. Las combinaciones de adyuvantes se administraron en una vacuna con el virus de la influenza A cepa Puerto Rico 8, con la finalidad de evaluar sus actividades inmunomoduladoras. Se observó un efecto sinérgico de los adyuvantes para inducir una respuesta celular tipo Th1/Th17 y se indujeron anticuerpos capaces de neutralizar la cepa de la vacuna y otras cepas heterólogas.

Agonistas de TLR4 y RIG-I entregados por nanopartículas realzan la respuesta inmune a una vacuna de subunidad para SARS-CoV-2 (22).

La pandemia causada por el SARS-CoV-2 demostró la necesidad de desarrollar vacunas que provean inmunidad a largo plazo, por lo que el presente estudio planteó el uso de adyuvantes moleculares en nanopartículas (NP) con un antígeno de proteína Spike estabilizada para activar a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y así estimular respuestas inmunes amplias y eficientes. Se estudiaron dos clases de PRRs: los TLRs y RIG-I, los cuales fueron estimulados por sus ligandos más comunes formulados en NP de (láctico-co-glicólico ácido)-polietilenoimina (PLGA-PEI): lípido monofosforilo A (MPLA), ligando de TLR4; poly-U/UC (PUUC), ligando de RIG-I; CpG, ligando de TLR9; y resiquimod (R848), ligando de TLR7/8. Para evaluar los efectos coadyuvantes primero generaron NP de

PLGA-PEI con MPLA, R848, o CpG más PUUC. Luego combinaron las NP con la subunidad S1 de la proteína Spike del SARS-CoV-2. Las fórmulas realizadas se estudiaron *in vitro* utilizando reacciones mixtas de leucocitos isogénicas (isoMLRs) e *in vivo* utilizando dos dosis intranasales e intramusculares en ratones. Como resultados se obtuvo que los NP MPLA-PUUC aumentan las respuestas de las células T pulmonares en ratones después de la vacunación intranasal con proteína Spike estabilizada del SARS-CoV-2. Los NP PUUC aumentan las respuestas humorales en ratones vacunados intramuscular con varias dosis de SARS-CoV-2 proteína Spike estabilizada y los NP adyuvantes combinados MPLA+PUUC no aumentan las respuestas humorales a la vacunación intramuscular con la proteína Spike del SARS-CoV-2 en comparación con las respuestas humorales con los NP PUUC.

Conclusión: La administración de nanopartículas agonistas del RIG-I, PUUC, y del ligando de TLR4, MPLA, aumentan la respuesta inmune a las vacunas de subunidades de proteínas Spike del SARS-COV2 en comparación con las vacunas sin adyuvantes.

El adyuvante activador de NOD2/RIG-I inarigivir realza la eficacia de la vacuna BCG contra la tuberculosis en ratones (23).

Se desarrollaron varios agonistas basados en híbridos de nucleótidos de moléculas pequeñas (SMNH) que activan a NOD2, así como también a RIG-I. Inarigivir, un compuesto derivado de SMNH, es un profármaco de éster de fosforotioato de dinucleósido que se convierte en el dinucleósido activo fosforotioato SB 9000 por hidrólisis mediada por esterasa *in vivo*. Tanto Inarigivir como SB 9000 son una mezcla de dos isómeros designados como Rp y Sp. Con el método SANDWICH ELISA se evaluó la unión del Inarigivir (SB 9000) a RIG-I; las señales de

enlace fueron registradas y analizadas por análisis de datos “Análisis módulo cinético” utilizando el software de evaluación BIA 4.1.

Las cepas de *M. tuberculosis* utilizadas fueron: la cepa H37Rv para infecciones *in vitro* y la cepa Edmarn para infección en ratones *in vivo*; la cepa de *M. bovis* BCG Pasteur (ATCC 35734) se utilizó para infecciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Para probar la efectividad del Inarigivir y otros componentes SMNH, las células presentadoras de antígenos (APCs) fueron preactivadas antes de la infección con BCG. Las citoquinas producidas fueron cuantificadas mediante kits de ELISA disponibles en el mercado (p.e.: Biolegend). Varios grupos de ratones fueron expuestos a las cepas de *M. tuberculosis* antes descritas con o sin el Inarigivir como adyuvante para luego determinar la variación entre grupos mediante ensayos de UFC y el análisis de varias poblaciones de células T en órganos a través de la tinción por citometría de flujo.

El resultado del uso de Inarigivir fue el aumento de la capacidad de las APCs de ratón infectado con BCG para secretar niveles elevados de IL-12, TNF- α , IFN- γ y citocina IL-1 β dependiente de caspasa-1. También aumentó la capacidad de los macrófagos para matar *M. tuberculosis*. Esta capacidad se asoció a la activación de la caspasa-1 y la autofagia. Además, aumentó la capacidad de las APCs infectadas por BCG para presentar el epítipo Ag85B-p25 a linfocitos T CD4 *in vitro*.

La de-acetilación del polímero derivado de quitina regula la activación de cGAS-STING y el inflamosoma NLRP3 dependiente de especies reactivas del oxígeno (24).

El quitosano es un polisacárido catiónico que ha sido evaluado como adyuvante debido a su biocompatibilidad y naturaleza biodegradable. C38, C49 y C72

(quitosanos deacetilados) se produjeron a partir de quitina (ChitiNor AS, CN141107) en un proceso patentado en Viscogel AB. El grado de deacetilación se determinó por HNMR. Los ratones utilizados en el estudio fueron donados por profesores de universidades en Estados Unidos, Australia y Suiza. Los equipos utilizados para la cuantificación de citoquinas fueron obtenidos de BD Biosciences (BD 555240), Santa Cruz Biotechnology Inc. (Capture antibody #sc-57201) y R&D systems (detection antibody #32401-1). Los kits ELISA IFN-g (DY485) CXCL10 (DY466) e IL-1b (DY401) se compraron a R&DSistemas.

Los antígenos estudiados fueron el antígeno de la vacuna *Mycobacterium tuberculosis*, híbrido 56 (H56) y la proteína de la membrana externa principal de *Chlamydia trachomatis* (MOMP). La vía de vacunación fue subcutánea o intramuscular con H56 con y sin adyuvantes o MOMP con y sin adyuvantes en el día 0 y 14; el día 21 los ratones fueron sacrificados para recolectar los ganglios linfáticos para el análisis de la respuesta específica al antígeno.

El estudio concluyó que se requiere de un alto grado de deacetilación en los adyuvantes derivados de quitina para mejorar la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS), lo que lleva a la inducción mediada por cGAS-STING de IFN tipo I. Así mismo la capacidad de los polímeros para activar el inflamosoma NLPR3 depende estrictamente del grado de deacetilación y generación de mtROS.

IL-1 y IL-1ra son reguladores clave de la respuesta inflamatoria a vacunas de ARN (25).

El objetivo del estudio es investigar la capacidad de las vacunas de ARN formuladas con lípidos para desencadenar la inmunidad innata. Para alcanzar el objetivo planteado se utilizaron ratones de 5 a 15 semanas de vida obtenidos de The

Jackson Laboratory. La sangre se obtuvo de donadores voluntarios que participaron en el GenenTech. Además, los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados con GraphPad Prism v.9.1.0 para Mac OS. Se crearon ilustraciones con BioRender.com. También se utilizó la prueba t de dos colas no pareada para comparación de dos grupos. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) cuando se compararon más de dos grupos y se compararon múltiples grupos usando la prueba post hoc de Dunnett o la prueba post hoc de Sidak.

El estudio arrojó múltiples resultados que demuestran que la IL-1 parece tener un papel significativo en la amplificación de las respuestas de citoquinas iniciadas por estímulos inmunes innatos tanto en humanos como en ratones, por lo que las vacunas de ARN no modificadas representan un método eficiente para inducir respuestas de células T específicas de antígeno cuando se proporciona suficiente estímulo innato. Sin embargo, estos resultados sugieren que, al igual que en ratones, los estudios preclínicos en primates no humanos (NHP) podrían no capturar completamente las toxicidades inflamatorias relacionadas con las vacunas de ARN. Además, la reactogenicidad del ARN modificado depende del contexto: el ARNmod puede ser no inmunoestimulante cuando se formula en liposomas (LPX), inducir una inmunoestimulación débil cuando se formula en LNP (MC3) o iniciar una potente respuesta innata cuando se formula en LNP (SM-102).

Mecanismos de inmunidad innata y adaptativa a la vacuna BNT162b2 de Pfizer-BioNTech (26).

El presente estudio trata de demostrar, mediante un análisis detallado de las respuestas inmunes innatas y adaptativas a la vacunación BNT162b2 en ratones, la respuesta inmune adaptativa inducida por BNT162b2 después de vacunas primarias y de refuerzo en órganos como el pulmón y el bazo. La respuesta inmune innata en

el drenaje de los ganglios linfáticos (dLN), ganglios linfáticos no drenantes y otros órganos a nivel unicelular, utilizar enfoques de inmunología de sistemas; y los mecanismos de detección innatos que regulan las respuestas específicas de antígeno de linfocitos T y anticuerpo a la vacunación con BNT162b2.

Para evaluar la respuesta, los ratones se inmunizaron por inyección intramuscular con BNT162b2. En los días 0 y 21 se demostró que la inmunización indujo una magnitud sorprendentemente alta de células B de centros germinales, células Th foliculares y células plasmáticas en dLN, que alcanzaron su punto máximo en el día 7 y disminuyeron en el día 21.

A los días 21 y 42 después de la inmunización también se evaluaron las respuestas de células T específicas de antígeno en bazo y pulmón. Mientras que la inmunización primaria provocó una respuesta detectable de células CD4 y CD8 en ambos tejidos, la inmunización secundaria tuvo una respuesta notable sobre todo en el pulmón.

Todas las citocinas, excepto el IFN-g, volvieron a los niveles normales en el día 3 después de la inmunización. Sorprendentemente, hubo una inducción significativa de IFN-a (IFN-a2 e IFN-a4) en ratones a las 6 h, lo que no se observó en humanos. Además, la activación de las células inmunes innatas medidas por la intensidad media de fluorescencia de la expresión de CD86 se redujo más sustancialmente en ratones en los que se eliminó las células T que en los ratones control o ratones en los que se eliminó las células NK.

El ligando de STING cGAMP potencia la eficacia de los linfocitos T CD8+ inducidos por vacunas (27).

Este estudio probó los efectos de los ligandos STING 2'3'cGAMP y 3'3'cGAMP en la inducción de células T CD8+ específicas de antígeno. Los PBMC fueron aislados y crío preservados de muestras de sangre venosa donadas por voluntarios sanos HLA-A2+. Los PBMC a su vez fueron cultivados en medio AIM suplementado con Flt3L para movilizar las células dendríticas (DCs). Después de 24 horas se añadió el péptido Melan-A EV20 (1 μ M) a los cultivos, y se indujo la maduración de DCs bajo diferentes condiciones de adyuvantes. El primer grupo de ratones fueron vacunados por vía intramuscular en el día 0 y 14 y subcutánea el día 21 del ensayo con PBS u OVA con o sin ligandos adyuvantes. EL segundo grupo de ratones fue vacunado con PBS solo o con adyuvantes de forma intranasal.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos directamente conjugados para teñir las células T CD8+ humanas y de ratones. Luego los datos fueron adquiridos utilizando citómetros de flujo LSR Fortessa o FACSCanto II (BD Biosciences) y analizados con la versión 9.3.7 del software FlowJo (Tree Star Inc.)

Se observaron diferencias significativas en los sujetos de estudio vacunados con PBS o NP-p24 solo en comparación con los vacunados con NP-p24 + 2'3'-cGAMP (menor pérdida de peso, mayor control de la respuesta viral mejora la inducción de linfocitos T CD8+ efectores, mejora la inducción y maduración funcional de células T CD8+ específicas de antígeno *in vivo*). Es por ello que se puede concluir que el cGAMP es un potente adyuvante para la inducción de respuestas de células T CD8+, lo que podría permitir nuevos enfoques inmunoterapéuticos y profilácticos al manejo de diversos cánceres y enfermedades infecciosas.

Un nuevo agonista quimérico de TLR7/NOD2 es un adyuvante potente para inducir respuestas inmunes en las mucosas (28).

Este estudio prueba la eficacia de los agonistas de TLR7 y NOD2. El agonista TLR7/NOD2 es una molécula híbrida que incorpora el agonista TLR7 CL239 unido covalentemente al agonista NOD2 MDP diseñado para estimular tanto TLR7 como NOD2.

Las nanopartículas fueron preparadas por nano precipitación. Los monocitos se purificaron a partir de sangre humana periférica. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron cultivadas y expuestas a diferentes ligandos. Para posteriormente medir las citocinas y quimiocinas presentes en sobrenadantes de cultivos de moDC utilizando un instrumento Luminex T200 en combinación con Bio-Rad.

Se observó que el agonista TLR7/NOD2 estimula significativamente a TLR7 y NOD2 en una forma dependiente de la dosis. También se demostró la capacidad del agonista TLR7/NOD2 para inducir la autofagia al observar que un 58% de células contenían al menos un autofagosoma después de la estimulación con el agonista. Se analizó la maduración de células dendríticas expuestas a TLR7/NOD2 mediante citometría que demostró que se indujo una expresión significativa de CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Además, el presente estudio confirmó la capacidad de TLR7/NOD2L para estimular células T CD4+ y T CD8+ tanto a nivel sistémico como mucoso.

La señalización por TLR7 da forma y mantiene a la diversidad de anticuerpos luego de inmunización con partículas similares a virus (29).

En este estudio se evaluó la función adyuvante de partículas similares a virus (VLP) derivadas del bacteriófago Qb. La producción de Qb-VLP y la expresión del

antígeno Feld 1 fue en *E. Coli*. Se obtuvieron partículas vacías de Qb y el Feld1 se purificó para posteriormente ser acoplados químicamente con ayuda de succinimidil-6. Luego la combinación Qb-VLP fue incubada y centrifugada. Los ratones de 7 semanas de vida fueron obtenidos de Países Bajos e inmunizados con inyecciones subcutáneas. Posteriormente se cosecharon los bazos de los ratones inmunizados. Además, el tejido del bazo se incrustó en Tissue-Tec OCT (Sakura, cat.4583) y se mantuvo en hielo seco, y luego se seccionó a diapositivas de 5 mma -20°C utilizando criostatos (Thermo Scientific).

Para evaluar la calidad de los anticuerpos producidos por los ratones inmunizados se utilizó ELISA estudiando dos placas que se realizaron paralelamente. El análisis de significancia se realizó en GraphPad PRISM 6.0.

Los resultados arrojaron que la deficiencia de TLR7 redujo las reacciones de centro germinal en la etapa temprana, lo que indica la señalización por TLR7 es de importancia para la maduración de anticuerpos, particularmente en respuestas tempranas. Además, la señalización TLR7 activó el cambio de isotipo a IgG2b/2c y suprimió la producción de IgG1.

Por último, se demostró que la señalización por TLR7 es responsable de la inducción y mantenimiento de una alta diversidad clonal. En conclusión, la señalización por TLR7, especialmente en las células B, impulsa la formación temprana de centros germinales y la maduración de la afinidad y es responsable de la inducción y mantenimiento de la diversidad del BCR.

Eficacia de un compuesto 2,4-diaminoquinazolina como adyuvante de vacunas intranasales para proteger contra infección por virus de la influenza A in vivo (30).

En este estudio se utilizó como adyuvante para una vacuna para la influenza al compuesto 31, un agonista de los receptores TLR7 y TLR8. Las células utilizadas en este estudio (HEK, Null1, hTLR7, hTLR8, mTLR7, mTLR8) fueron compradas a InvivoGen. Los virus fueron donados por la Universidad de Chung-Ang. Las células fueron cultivadas y expuestas al compuesto 31 e imiquimod por 24 horas. La citometría de las diluciones dobles de cada muestra se sometió al método ELISA para medir los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α mientras que la concentración absoluta de citoquinas se determinó a partir de las curvas estándar lineales correspondientes. Las estadísticas analíticas fueron sometidas bajo ANOVA.

Los ratones fueron inmunizados con el virus PR8 inactivado como vacuna sola y en combinación con concentraciones crecientes del componente 31. Algunos de los ratones utilizados en el estudio fueron sacrificados después de la inmunización para comprobar la titulación o histopatología del ARN viral pulmonar. Además, los ratones fueron sacrificados cuando perdían más del 30% del peso corporal.

Gracias al marcador de la actividad promotora de NF- κ B se verificó que el compuesto 31 es un agonista dual TLR7/8, mientras que imiquimod es un agonista selectivo de TLR7. Así mismo, se demostró que la cantidad de TNF- α fue mayor en las muestras tratadas con compuesto 31 que en las tratadas con resiquimod. Juntos, ambos resultados indicaron que al activar la vía de señalización de TLR7, el compuesto 31 induce la expresión de citoquinas proinflamatorias endógenas, como IL-6 y TNF- α en células inmunes, además de mejorar las respuestas de anticuerpos tanto mucosos como serológicos. Por lo que se puede concluir que la dosis

optimizada del compuesto 31 mejora la eficacia protectora de una vacuna de dosis única al reducir la patogénesis pulmonar mediada por infección.

3M-052, un agonista sintético de TLR-7/8, induce células plasmáticas e inmunidad humoral específicas para la envoltura del HIV-1 durables en primates no humanos (31).

3M052 es una imidazoquinolina sintética ligando de TLR7/8 que es un candidato para adyuvante de vacunas. El estudio involucró a 60 macacos distribuidos entre 6 cohortes y 4 asignados para necropsia a las cuatro semanas de la última inmunización. Los macacos se sometieron a tres tipos de combinaciones de coadyuvantes: Env y aluminio, Env y GLA solubles, 3M-052 y una combinación de GLA+3M-052, respectivamente y Env soluble y R848 y una combinación de MPL y R848, respectivamente; donde en todos los adyuvantes se formularon en nanopartículas del polímero PLGA (PLGA NPs). Todos los animales se incluyeron en los análisis estadísticos.

El estudio demostró la potente adyuvancia de 3M-052 para inducir una magnitud y durabilidad superiores de plasma blastos sanguíneos y células plasmáticas de larga vida (LLPC) residentes en la médula ósea (BM) en comparación con otros adyuvantes utilizados en el estudio. También, induce respuestas de anticuerpos neutralizantes (nAb) del virus del VIH-1 mejoradas y duraderas en los macacos.

Otro hallazgo demuestra que el adyuvante 3M-052 con o sin GLA en PLGA NPs es capaz de orquestar fuertes respuestas celulares y serológicas en primates sin aumentar la frecuencia de células T CD4+ diana en la mucosa rectal, concluyendo que el agonista 3M-052 incluso en ausencia de GLA como adyuvante, demuestra

potencial para mejorar tanto el pico como la durabilidad de las funciones efectoras no neutralizantes claves deseadas en las respuestas de anticuerpos específicos para el VIH.

Efecto adyuvante de un agonista de TLR7 adsorbido a hidróxido de aluminio (AS37): un estudio de escalación de dosis, aleatorizado, de fase I de una vacuna conjugada para el meningococo C adyuvantada con AS37 (32).

El papel de los adyuvantes es fundamental para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas o desarrollar nuevas vacunas, con la finalidad de lograr una cooperación más eficaz de las células T para inducir una mejor respuesta de anticuerpos o inducir células T CD4+ o TCD8+ efectoras para eliminar los patógenos. Acorde con lo antes dicho, el presente estudio permitió evaluar el impacto de diferentes dosis de AS37 en vacunas en investigación.

La selección de los participantes fue aleatorizada; se inscribieron adultos sanos entre los 18 y 45 años que estuvieron en constante monitoreo. El tipo de vacuna que recibieron también se eligió de forma aleatorizada: un grupo recibió una dosis intramuscular única de la vacuna conjugada para meningococo C (MenC) autorizada MenC-CRM197 con hidróxido de aluminio como adyuvante, y el otro grupo recibió la vacuna en investigación, AS37-MenC-CRM197. Los datos se recogieron de manera ciega al observador, es decir que los receptores y los responsables de la evaluación desconocían que vacuna fue administrada.

Como resultado se obtuvo 80 adultos caucásicos de entre 18 y 45 años, de los cuales un 100% informó un efecto adverso local (dolor en el lugar de la inyección) y 44-75% informaron un efecto adverso sistémico siendo el más común el dolor de

cabeza y fatiga. No hubo efectos adversos que ameritaran la discontinuidad del estudio.

La respuesta inmunitaria se midió mediante un ensayo de actividad bactericida del complemento (hSBA) contra MenC y mediante ELISA. No hubo una relación dosis-respuesta y las tasas de respuesta se mantuvieron equilibradas en todos los grupos de estudio, sin embargo, mediante ELISA se apreció una tendencia a títulos de anticuerpos específicos para MenC más alto en el grupo que recibió AS37 en comparación con el grupo control.

Alto título de anticuerpos neutralizantes contra la variante delta del SARS-CoV-2 inducido por antígenos Spike triméricos adyuvantados con Alhydroxyquim-II (33).

Las vacunas contra el COVID-19 han tenido un impacto notable en países de ingresos medios y bajos; sin embargo, su acceso es limitado y esto constituye un problema crítico. Un determinante clave en la inmunidad conferida por las vacunas para el COVID-19 son los anticuerpos neutralizantes (NABs). Existen adyuvantes que contribuyen a mejorar los niveles de NABs y que por ende en combinación con las vacunas pueden proveer una inmunidad más eficaz.

El adyuvante Alhydroxiqum-II es una molécula pequeña agonista de Toll-Like Receptor (TLR) 7/8 que contribuye a la obtención de NABs de alto título. Para crear la vacuna que se utilizó en este estudio, CoVac-II, se combinó la proteína Spike trimérica con Alhydroxiqum-II (AHQ-II).

La vacunación en ratones con la vacuna CoVac-II indujo NAB de alto título en el plasma tan solo a 2 semanas de la inmunización y aumentaron más después del refuerzo, permaneciendo elevados hasta 252 días después de la vacunación. El

patrón de inmunidad de células T inducida por la vacuna fue evaluada por el nivel de células Th1 en células mononucleares de sangre periférica donde se observó una alta frecuencia de células T CD4+ multifuncionales y CD4+IFN-g+IL-2+TNF+, las cuales estaban ausentes en ratones vacunados con SpKAlum (antígeno Spike solo).

La capacidad neutralizante de la vacuna CoVac-II se analizó utilizando cepas de Wuhan y variantes alfa y beta. Como resultado, las muestras de plasma de ratones neutralizaron ambas variantes. Por lo tanto, AHQ-II puede complementar la inmunogenicidad de la vacuna.

En conclusión, la vacuna del estudio demuestra una notable longevidad de las respuestas inmunitarias y su alta inmunogenicidad es capaz de neutralizar eficazmente las variantes preocupantes del SARS-CoV-2 mostrando altos niveles de protección en humanos.

Una vacuna conjugada adyuvante-proteína con un agonista de TLR7 incorporado a S1 induce inmunidad potente contra el SARS-CoV-2 y variantes relevantes (34).

El presente estudio diseñó una vacuna candidata mediante la conjugación del adyuvante agonista de TLR7 (TLR7a) y la subunidad S1 de la proteína Spike del SARS-CoV-2 con la hipótesis de que varias moléculas del adyuvante incorporadas proporcionen un efecto de agregación, previniendo la toxicidad y facilitando la administración conjunta de adyuvante y antígeno. Con el fin de obtener una respuesta inmunitaria eficaz, se evaluaron vacunas con diferentes cantidades de adyuvante incorporado.

Los ratones fueron inmunizados por inyección subcutánea cada 2 semanas. Para evaluar la respuesta inmune de las células T se recolectaron muestras de bazo

de los ratones de prueba en el día 35 y se analizaron a través de un ensayo de ELISpot para IFN-g.

Los resultados demostraron que la molécula adyuvante incorporada TLR7a proporcionó un efecto adyuvante y disminuyó la toxicidad permitiendo la administración conjunta de adyuvante y antígeno. La vacuna TLR7a (10)-S1 provocó una inmunidad más robusta y una respuesta TH1/TH2 más equilibrada y demostró una buena capacidad neutralizadora con todas las variantes de importancia. También se observó títulos de IgG superiores, lo que sugiere que TLR7a puede inducir un cambio de isotipo de anticuerpos. Además, se observó una alta proporción de células T CD4+ y CD8+ que secretan citocinas doblemente positivas para TNF-a e IFN-g.

Respuesta inmune sesgada a Th1 de una vacuna de virión completo inactivado para SARS-CoV-2 y su evaluación de seguridad (35).

El presente estudio formuló una vacuna candidata contra el SARS-Cov-2 (BBV152) inactivada con virión completo (WVI) utilizando el adyuvante con gel de hidróxido de aluminio (Algel) o con Algel quimiadsorbido a un agonista de TLR7/8 (Algel-IMDG).

Para el aislamiento y selección de cepas se recolectaron y secuenciaron muestras de pacientes infectados durante el brote inicial en India, en un centro colaborador de la OMS para infecciones virales emergentes. La cepa (NIV 2020-770) para la vacuna es la cepa más prevalente en la India y es idéntica en un 99.97% a la cepa más antigua de Wuhan.

Posterior a la elección de la cepa, la semilla se adaptó a una plataforma de células GMP, se replicó y después la b-propiolactona se utilizó para la inactivación del virus. Se realizaron tres procedimientos de inactivación consecutivos. Una vez

inactivo el virión completo contra el SARS-CoV-2, se formularon las vacunas con los dos adyuvantes a base de aluminio con o sin el agonista de TLR7/8.

Las vacunas fueron probadas en tres modelos de animales: ratas, ratones y conejos. Los resultados arrojaron que las formulaciones diseñadas con adyuvante no indicaron ningún cambio patológico indeseable ni toxicidad sistémica a excepción de la reactividad local en el lugar de la inyección. También, se demostró que las formulaciones de vacunas indujeron respuestas de anticuerpos neutralizadores y capaces de unirse al antígeno significativamente elevadas en los animales inmunizados exhibiendo una excelente inmunogenicidad; cabe recalcar que no se observaron diferencias en títulos de anticuerpos estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de antígeno (3mg y 6mg). Además, la formulación estudiada neutralizó 10 cepas fundamentales de SARS-COV-2 lo que indica una neutralización más amplia para múltiples cepas de SARS-COV-2 que circulan en todo el mundo.

En conclusión, se demostró la capacidad de inducir una respuesta inmune sesgada a Th1 y que la presencia de proteína S y N en la vacuna candidata formulada en Algel-IMDG provoca una respuesta inmunitaria altamente eficaz y multifuncional para diversas variantes.

Agonistas de TLR3 y TLR7/8 mejoran el resultado de la inmunización en ratones expuestos a nicotina por mecanismos distintos (36).

Se sabe que la nicotina, componente del humo del cigarrillo, es un inmunosupresor que interrumpe las funciones de las células dendríticas (DC) y su interacción con las células asesinas naturales (células NK). El presente estudio pretende demostrar que los adyuvantes agonistas de TLR seleccionados podrían

reducir estos efectos degradantes de la nicotina en las respuestas inmunitarias mediadas por DC-NK.

Para el estudio se adquirieron ratones macho de 6-8 semanas de edad y fueron criados y mantenidos en condiciones libres de patógenos. Para la administración de nicotina se les implantaron bombas osmóticas por vía subcutánea. Así mismo, por vía subcutánea se les implantó proteína OVA, agonistas de TLR y gel de hidroxilo de aluminio para evaluar el reclutamiento de NK y las respuestas mediadas por células.

Los análisis estadísticos se realizaron a través de la prueba t de Student de dos colas para datos emparejados y no emparejados con un intervalo de confianza del 95% para la comparación entre los expuestos y no expuestos a la nicotina. Se consideró significativos valores de p igual o inferior a 0.05.

Como resultado se obtuvo que la exposición a la nicotina afectó diferencialmente la respuesta inmune en ratones inmunizados. Se utilizaron los agonistas de TLR Poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), y R848 (TLR7/8). Las muestras con Alum y Poly(I:C) arrojaron respuestas similares a ratones de control, mientras que el uso de LPS redujo la respuesta celular en ratones inmunizados. Por otra parte, el R848 mejoró ligeramente la respuesta celular en ratones expuestos a la nicotina. Todos los agonistas de TLR indujeron a niveles más altos de IgG. Además, se evidenció que los agonistas de TLR3 indujeron respuestas inmunitarias eficaces en los ratones de control y los ratones expuestos a nicotina al provocar un reclutamiento de células NK mayor.

En conclusión, se indujeron respuestas inmunitarias humorales y medidas por células tanto en ratones expuestos y no expuestos a la nicotina. Los agonistas reclutaron más células NK y el efecto adyuvante del agonista depende de las células

NK y del IFN-g derivado de dichas células por lo que podrían potencialmente mejorar la inmunidad de las vacunas estándar.

Una vacuna bivalente para CMV formulada con el agonista de TLR9 compatible con humano CpG1018 induce inmunidad humoral y celular potente en ratones que expresan HLA (37).

El presente estudio diseñó y puso a prueba una nueva formulación de vacuna de subunidad bivalente basada en la glicoproteína B (gB) oligomérica codificada por el citomegalovirus (CMV) y una proteína sintética que contiene múltiples epítopes del mismo virus, en combinación con el agonista de TLR9 compatible con humanos CpG1018.

El primer conjunto de experimentos evaluó la inmunogenicidad de la vacuna en ratones que expresan HLA inmunizados con un régimen de dos dosis el día 1 y 21 del estudio. Posteriormente, se recolectaron muestras de bazo y sangre 7 días después del refuerzo para evaluar la respuesta humoral y la respuesta de las células TCD4+ y CD8+ demostrándose que la mayoría de las células expresaban múltiples citocinas incluidas IFN-g, TNF e IL-2 o IFN-g y TNF. Además, se observaron importantes niveles de IgM e IgG1 similares a TH2 en todos los ratones que expresan HLA; estos anticuerpos neutralizaron el CMV y bloquearon la infección en fibroblastos y células epiteliales por lo que se puede decir que la formulación de la vacuna contra el CMV es capaz de inducir respuestas importantes de células TCD4+ y CD8+ específicas para CMV.

En conclusión, la vacuna CMV bivalente formulada con proteínas CMVpoly y gB con adyuvante CpG1018 es altamente inmunogénica en múltiples ratones que

expresan HLA y puede inducir respuestas inmunes humorales y celulares duraderas y multifactoras contra CMV.

El ODN CpG como adyuvante realza el vigor de los linfocitos B al bloquear la regulación negativa del TLR9 de superficie para aumentar la respuesta de anticuerpos a vacunas (38).

La activación endosomal dependiente de TLR9 en las células B se ha documentado como uno de los principales mecanismos para que el oligodesoxinucleótido monocatenario CpG 5805 (CpG ODN) se use como un nuevo adyuvante para vacunas microbianas, por lo que el estudio pretendió demostrar que usar CpG ODN produce respuestas de anticuerpos mejoradas.

Para el estudio se utilizaron ratones hembra de 8 semanas de edad que se mantuvieron microaisladas e inmunizadas por vía intramuscular dos veces con la vacuna contra la hepatitis B sola y en presencia del adyuvante CpG 5805 el día 0 y 28 del estudio. Posteriormente, se recolectaron muestras de los bazo de los ratones y se cultivaron los esplenocitos durante 48h.

Las densidades ópticas se leyeron en un lector ELISA en los sueros analizados. Además, para analizar el movimiento de TLR9 desde la superficie celular hasta las endosomas se desarrolló un ensayo de alimentación de anticuerpos modificado. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando análisis de pruebas t no pareadas. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Cabe recalcar que todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces.

El estudio demostró que el efecto de CpG ODN como adyuvante de vacunas en la mejora de las respuestas de anticuerpos de vacunas a través de la vía de señalización de TLR9 al producir niveles de anticuerpos específicos para el antígeno

de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) significativamente más altos que en los ratones inmunizados sin el adyuvante. Además, los resultados sugieren que puede mejorar la respuesta de anticuerpos activando la vía de señalización de TLR9 seguida de una mayor producción de factores para la activación y diferenciación de células B, citoquinas relacionadas con Th2 e interferón tipo I. También se evidenció que CpG ODN puede inducir la blastogénesis de las células B durante su promoción de la internalización y movilización de sTLR9 en la endosoma intracelular.

Un peculiar agonista nanoparticulado del TLR9 confiere a la vacuna dividida de HA conferir protección mediada por FcγR contra la infección letal heteróloga por virus de la influenza (39).

Al igual que con otras vacunas, el desarrollo de una vacuna contra la influenza que tenga una respuesta más eficaz y duradera es una prioridad de la salud pública mundial por lo que el presente estudio tuvo como objetivo el desarrollo de una vacuna con el adyuvante K3-SPG que está compuesto por nanopartículas de oligodesoxinucleótidos K3, un agonista de TLR9, y SPG, un β-glucano ligando no agonista del receptor Dectin-1.

Se utilizaron ratones femeninos de 6 semanas de vida a los cuales se les aplicó la vacuna de la influenza con o sin aluminio, Addavax o K3-SPG, todos adyuvantes, de forma intramuscular en el día 0 y 28 del estudio. El día 35 del estudio se les aplicó de forma intranasal los virus H1N1 PR8 o H1N1 NC. A los días 32, 33, 34, 38, 42 y 46 se les aplicó una inyección intraperitoneal de Anti-CD8a.

Los niveles de IgG en suero se determinaron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Como resultados se obtuvo que la inmunización con K3-SPG cambia la calidad de las células B del centro germinal (CG) y es importante destacar que la frecuencia de células B específicas para hemaglutinina (HA) fue significativamente mayor. En conclusión, la selección del adyuvante influyó en el cambio de isotipo de IgG específica de antígeno a través de la reacción de CG y fueron consistentes con los datos serológicos. Además, K3-SPG-HA provocó una respuesta anti-HA IgG2c más prominente, no solo para la cepa NC homóloga sino también para el IAV PR8 heterólogo y potencialmente otras cepas IAV antigénicamente distantes. Sin embargo, K3SPG no fue capaz de conferir protección contra la exposición a virus en ratones deficientes en FcγR.

CAPÍTULO CUATRO

4. DISCUSIÓN

4.1. Vacunas que contienen ARN

Existen vacunas que contienen ARN, ya sea como parte de estrategia para administrar el antígeno o que se incorporan a la vacuna en el momento de producción. En los estudios revisados se evidencia que es capaz de estimular los PRRs, afectando así la respuesta inmune derivado de la vacuna. Por ejemplo, Tahtinen et al. demostraron que las vacunas de ARN formuladas en liposomas son capaces de estimular TLR7 y 8 en monocitos y macrófagos humanos tanto in vitro como in vivo. Esto conduce a activación del inflamosoma NLRP3 y secreción de la citocina proinflamatoria IL-1, la cual a su vez induce producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF (25).

Para evitar estos efectos, que puede causar excesiva inflamación, muchas vacunas modifican el ARN usando nucleótidos alterados de uracilo y citosina, con lo cual ya no se une al TLR7/8. Un ejemplo es la vacuna de ARNm BNT162b2 que codifica la proteína Spike de SARS-CoV-2. Como se mencionó este ARN no activa los receptores TLR 7/8, pero puede formar estructuras de doble cadena que activan al receptor MDA5, induciendo la secreción de interferones tipo I. Esto estimula monocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK en ganglios linfáticos que drenan el sitio de vacunación. Un desenlace importante es que las células NK producen una importante cantidad de IFN-g (26)

Como último ejemplo se ha visto que durante la producción de partículas similares a virus para vacunas en *E. coli* estas se cargan exponencialmente con ARN procariótico de una cadena el cual estimula TLR7 y esto derivó en respuestas eficientes y diversas de linfocitos B específicos para un antígeno contenido en las

partículas. Esto incluyó la formación de centros germinales y producción de anticuerpos de alta afinidad (29).

4.2. Ligandos de los TLRs

La importancia de los TLRs en la generación de respuestas inmunes es ampliamente reconocida por lo que, se han derivado varios adyuvantes. En este grupo tenemos ligandos de TLR 3, TLR 7, TLR 8 y TLR 9.

El estudio de Nouri-Shirazi & Guinet usa Poly I:C, un ligando de TLR3, en combinación con R848 que actúa como ligando de TLR8 en una vacuna con el antígeno modelo ovoalbúmina demostrando que la señal de estos adyuvantes resultó en reclutamiento y activación de células NK productoras de IFN- γ , así como en la activación de células dendríticas y su producción de IL-1 β . Estos efectos fueron mejores en comparación con otros adyuvantes como hidróxido de aluminio y CpG (36).

Por otro lado, se han ensayado nuevos compuestos sintéticos que se unen a TLR-7 y TLR-8. El Compuesto 31- diaminoquinazolina que activa a los TLRs 7 y 8 usado como adyuvante en una vacuna de la influenza de virus inactivado lo que induce secreción de TNF- α e IL-6 por macrófagos y logra aumentar la producción de anticuerpos neutralizantes específicos para el virus con relación a la vacuna sola. Estos incluyen IgG en plasma e IgA en las vías respiratorias. Esto se asoció a una protección de enfermedad en un modelo experimental, con menor pérdida de peso y mayor supervivencia (30).

Por su parte, 3M052 es una imidazoquinolina sintética que tiene un grupo acil de 18 carbonos que le da más hidrofobicidad que el R848, que es un ligando más antiguo de estos receptores. Esto disminuye su diseminación sistémica y aumenta su

biodisponibilidad en el sitio de aplicación de la vacuna de 3M052. Su uso como adyuvante, en una vacuna para VIH que tiene el antígeno Env, induce activación vigorosa de un subgrupo de monocitos que se ha demostrado sostienen la diferenciación de plasmablastos los cuales dan origen a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Además, genera células plasmáticas de larga vida específicas para Env y una respuesta de anticuerpos duradera superior a lo inducido por otros adyuvantes (R848, aluminio, GLA y MPL). También fue más intensa la respuesta de centros germinales, la generación de linfocitos T foliculares y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (31).

Otro agonista de TLR7 del grupo de las benzazepinas es TLR7a. En una vacuna para meningococo don se usó adsorbido en hidróxido de aluminio, este adyuvante fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos duradera, pero no hubo diferencias con el grupo control que recibió la vacuna con hidróxido de aluminio como adyuvante (32). En cambio, cuando se usó TLR7a conjugado a la proteína S1 del SARS-CoV-2 en ratones indujo una mayor producción de IgG específica para el antígeno en comparación con el uso de la proteína sin adyuvante o con el hidróxido de aluminio como adyuvante. También se obtuvo una mayor proporción de isotipos dependientes de la respuesta Th1 (IgG2a e IgG2b), mayor número de linfocitos T secretores de IFN-g y neutralización efectiva que fue observada para 4 variantes del virus ensayadas (34).

En cuanto a ligandos de TLR 9, estudios recientes han ensayado a los adyuvantes CpG1018 y K3. El primero es un oligodeoxinucléotido tipo B que fue usado con una vacuna para CMV compuesta por la glicoproteína B y una proteína artificial con múltiples epítomos que se presentan en MHC-I. Indujo expansión y activación de linfocitos T CD4 y CD8 específicos para las proteínas de CMV de la

vacuna, así como anticuerpos neutralizantes. Esta inmunidad fue de larga duración. Por su parte K3 es un adyuvante que consiste en oligonucleótidos derivados de las secuencias CpG que son ligando de TLR9 pero que se prepara en forma de nanopartículas. Su uso con una vacuna de influenza fue capaz de inducir protección tanto a la cepa del antígeno de la vacuna como a una cepa heteróloga, lo cual no se logró con el antígeno solo ni con otros 2 adyuvantes comunes (aluminio y escualeno). Este efecto se dio por secreción preferencial de ciertos subtipos de IgG y mecanismos dependientes de los receptores para la porción Fc de los anticuerpos distintos a la neutralización como citotoxicidad y opsonización. Esto es importante porque estos mecanismos son llevados a cabo por anticuerpos específicos para el tallo de la hemaglutinina, el cual no varía de cepa a cepa. Esto puede lograr una cobertura amplia, lo cual es fundamental para tener vacunas efectivas (39).

4.3. Ligandos de PRRs citoplasmáticos

Recientemente se han descrito una gran cantidad de PRRs citoplasmáticos, ampliamente expresados en el organismo y son capaces de iniciar y modular la respuesta inmune. Por esto, constituyen un blanco importante para los nuevos adyuvantes. En este trabajo se han revisado estudios de compuestos que estimulan RIG-1, NOD-2, cGAS y NLRP3.

En primer lugar, IVT-DI es un adyuvante que se basa en un ARN transcrito in vitro a partir de una secuencia del virus Sendai de la cepa Cantel, que posee una región de doble cadena y un extremo 5 trifosfato, estructura que le confiere agonismo de RIG-I. Al administrarlo en combinación con la proteína Spike de SARS-CoV-2, por vía inhalatoria con la finalidad de entrar directamente en la mucosa, induce la expresión de IFN-Is y genes estimulados por interferón y fomenta la generación de

linfocitos Th1 y anticuerpos neutralizantes, generando una reacción cruzada que cubre a variantes heterólogas (20).

En otro estudio, IVT-DI y Poly I:C se formularon junto al adyuvante 3php, otro agonista de RIG-I, en vacunas para SARS-CoV-2 y virus de la influenza H1N1. Estas se administraron por la vía intranasal para seguir la misma ruta de los virus e indujeron una respuesta con predominancia de Th1/Th17 y una respuesta de anticuerpos neutralizante robusta y duradera, con especificidad por el tallo de la hemaglutinina que crea reacción cruzada entre variantes (21).

PUUC es un agonista de RIG-I que se basa en una secuencia de ARN del virus de la hepatitis C. En combinación con R848, MPLA o CpG indujo secreción de citocinas proinflamatorias por Células presentadoras de antígenos (APCs), mientras que en el sistema inmune adaptativo al combinar PUUC y MPLA (ligando de TLR4) como adyuvantes en una vacuna con el antígeno S1 del SARS-CoV-2 se generaron respuestas inmunes vigorosas con generación de linfocitos T de memoria, centros germinales e IgG neutralizante (22).

El Inarigivir es un dinucleótido derivado de pequeñas moléculas de ácidos nucleicos que activa RIG-I y NOD2, mostrando una actividad antivírica. Se demostró que los macrófagos que recibían BCG con el adyuvante Inarigivir son capaces de matar a los bacilos de manera más efectiva, mientras que las APCs secretan más cantidades de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Así mismo, la presentación de antígenos por APCs que recibieron BCG con el adyuvante Inarigivir fue más efectiva en la activación de linfocitos T CD4 específicos para *Mycobacterium tuberculosis* y generó memoria inmunológica duradera. Esto resultó en una mejor defensa con una carga

pulmonar de micobacterias luego de una infección significativamente menor en relación con la vacuna usada con otro adyuvante (muramil dipéptido) (23).

El quitosán es un polisacárido catiónico derivado de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y algunos hongos por lo que es un compuesto biodegradable. Induce producción de radicales libres del oxígeno mitocondriales, lo cual estimula dos PRRs que reconocen ácidos nucleicos: cGAS y NLRP3. La vía e cGAS-STING induce producción de interferones tipo I mientras que la activación del inflamosoma NLRP3 genera secreción de IL-1b. Estas citocinas a su vez inducen la activación de células dendríticas, la cual se comprobó por medio de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. El quitosán usado como adyuvante en dos vacunas experimentales, una contra *Mycobacterium tuberculosis* y otra contra *Chlamydia trachomatis*, fue capaz de inducir inmunidad específica de tipo Th1 evaluada por la secreción de IFN-g en bazo y ganglios linfáticos (24).

Por último los nucleótidos cíclicos 2'3'cGAMP y 3'3'cGAMP se generan por estímulo de cGAMP sintasa (cGAS) de ADN o bacterias, respectivamente, pero también se usan como ligandos sintéticos de STING. cGAMP a través del estímulo de STING inducen maduración y activación de células dendríticas que secretan IFN- α , el cual es fundamental para generar una respuesta efectiva de linfocito T CD8. Fue capaz de inducir activación de linfocitos T CD8 con mayor potencia que otros adyuvantes, medida por expresión del factor de transcripción T-bet y de moléculas citotóxicas. Esto se tradujo en una eficiente protección por linfocitos T CD8 en modelos de enfermedades tumorales y virales *in vivo* (27).

CONCLUSIONES

- Un adyuvante debe cumplir con varias características que le permitan ser apto para su uso. A pesar de todos los avances en este campo, no se ha logrado encontrar un adyuvante que cumpla con todos estos requisitos, ya que no todos los factores son dependientes del adyuvante si no también dependientes del antígeno usado en la vacuna y de la respuesta inmunitaria de la persona que recibe el fármaco. Por esto, para uso masivo se debe conocer sus efectos secundarios y el grado de toxicidad de estos.
- Con la finalidad de obtener vacunas eficaces y seguras que aseguren la prevención y control de enfermedades infecciosas en la población, es importante contar con adyuvantes que induzcan una respuesta que simule la respuesta natural al antígeno, mediante la potenciación de la inmunidad celular y la producción de anticuerpos, sin dejar de tomar en cuenta el perfil de seguridad de estas.

REFERENCIAS

1. Pandey SC, Pande V, Sati D, Upreti S, Samant M. Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. *Life Sci.* 1 de septiembre de 2020;256:117956.
2. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 12 de abril de 2011;29(17):3341-55.
3. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:594.
4. Kano N, Ong GH, Ori D, Kawai T. Pathophysiological Role of Nucleic Acid-Sensing Pattern Recognition Receptors in Inflammatory Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022 [citado 8 de noviembre de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.910654>
5. Okude H, Ori D, Kawai T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [citado 8 de noviembre de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.625833>
6. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* junio de 2011;12(6):509-17.
7. Kang SM, Compans RW. Host responses from innate to adaptive immunity after vaccination: Molecular and cellular events. *Mol Cells.* 1 de enero de 2009;27(1):5-14.

8. Tatematsu M, Funami K, Seya T, Matsumoto M. Extracellular RNA Sensing by Pattern Recognition Receptors. *J Innate Immun.* 2018;10(5-6):398-406.
9. Hennessy C, McKernan DP. Anti-Viral Pattern Recognition Receptors as Therapeutic Targets. *Cells.* septiembre de 2021;10(9):2258.
10. Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology.* noviembre de 2013;218(11):1322-35.
11. Murthy AMV, Robinson N, Kumar S. Crosstalk between cGAS–STING signaling and cell death. *Cell Death Differ.* noviembre de 2020;27(11):2989-3003.
12. Maisonneuve C, Bertholet S, Philpott DJ, De Gregorio E. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 de agosto de 2014;111(34):12294-9.
13. Ahn J, Barber GN. STING signaling and host defense against microbial infection. *Exp Mol Med.* 11 de diciembre de 2019;51(12):1-10.
14. De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S. Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines. *Trends Mol Med.* 1 de marzo de 2017;23(3):216-26.
15. Ong GH, Lian BSX, Kawasaki T, Kawai T. Exploration of Pattern Recognition Receptor Agonists as Candidate Adjuvants. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 [citado 8 de noviembre de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.745016>
16. Arvin AM, Greenberg HB. New viral vaccines. *Virology.* 5 de enero de 2006;344(1):240-9.

17. Luchner M, Reinke S, Milicic A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. *Pharmaceutics*. febrero de 2021;13(2):142.
18. Khalid K, Padda J, Khedr A, Ismail D, Zubair U, Al-Ewaidat OA, et al. HIV and Messenger RNA (mRNA) Vaccine. *Cureus*. julio de 2021;13(7):e16197.
19. Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y, Wei X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer*. 16 de febrero de 2021;20:33.
20. Jangra S, Landers JJ, Rathnasinghe R, O'Konek JJ, Janczak KW, Cascalho M, et al. A Combination Adjuvant for the Induction of Potent Antiviral Immune Responses for a Recombinant SARS-CoV-2 Protein Vaccine. *Front Immunol*. 2021;12:729189.
21. Wong PT, Goff PH, Sun RJ, Ruge MJ, Ermler ME, Sebring A, et al. Combined Intranasal Nanoemulsion and RIG-I Activating RNA Adjuvants Enhance Mucosal, Humoral, and Cellular Immunity to Influenza Virus. *Mol Pharm*. 1 de febrero de 2021;18(2):679-98.
22. Atalis A, Keenum MC, Pandey B, Beach A, Pradhan P, Vantucci C, et al. Nanoparticle-delivered TLR4 and RIG-I agonists enhance immune response to SARS-CoV-2 subunit vaccine. *J Control Release Off J Control Release Soc*. julio de 2022;347:476-88.
23. Khan A, Singh VK, Mishra A, Soudani E, Bakhru P, Singh CR, et al. NOD2/RIG-I Activating Inarigivir Adjuvant Enhances the Efficacy of BCG Vaccine Against Tuberculosis in Mice. *Front Immunol*. 2020;11:592333.

24. Turley JL, Moran HBT, McEntee CP, O'Grady K, Muñoz-Wolf N, Jin L, et al. Chitin-derived polymer deacetylation regulates mitochondrial reactive oxygen species dependent cGAS-STING and NLRP3 inflammasome activation. *Biomaterials*. agosto de 2021;275:120961.
25. Tahtinen S, Tong AJ, Himmels P, Oh J, Paler-Martinez A, Kim L, et al. IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol*. abril de 2022;23(4):532-42.
26. Li C, Lee A, Grigoryan L, Arunachalam PS, Scott MKD, Trisal M, et al. Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. *Nat Immunol*. abril de 2022;23(4):543-55.
27. Gutjahr A, Papagno L, Nicoli F, Kanuma T, Kuse N, Cabral-Piccin MP, et al. The STING ligand cGAMP potentiates the efficacy of vaccine-induced CD8+ T cells. *JCI Insight*. 4 de abril de 2019;4(7):125107.
28. Gutjahr A, Papagno L, Vernejoul F, Lioux T, Jospin F, Chanut B, et al. New chimeric TLR7/NOD2 agonist is a potent adjuvant to induce mucosal immune responses. *EBioMedicine*. agosto de 2020;58:102922.
29. Chang X, Krenger P, Krueger CC, Zha L, Han J, Yermanos A, et al. TLR7 Signaling Shapes and Maintains Antibody Diversity Upon Virus-Like Particle Immunization. *Front Immunol* [Internet]. 2022 [citado 17 de octubre de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.827256>
30. Noh K, Jeong EJ, An T, Shin JS, Kim H, Han SB, et al. The efficacy of a 2,4-diaminoquinazoline compound as an intranasal vaccine adjuvant to protect against influenza A virus infection in vivo. *J Microbiol*. mayo de 2022;60(5):550-9.

31. Kasturi SP, Rasheed MAU, Havenar-Daughton C, Pham M, Legere T, Sher ZJ, et al. 3M-052, a synthetic TLR-7/8 agonist, induces durable HIV-1 envelope-specific plasma cells and humoral immunity in nonhuman primates. *Sci Immunol.* 19 de junio de 2020;5(48):eabb1025.
32. Gonzalez-Lopez A, Oostendorp J, Koernicke T, Fadini T, D'Oro U, Baker S, et al. Adjuvant effect of TLR7 agonist adsorbed on aluminum hydroxide (AS37): A phase I randomized, dose escalation study of an AS37-adjuvanted meningococcal C conjugated vaccine. *Clin Immunol Orlando Fla.* diciembre de 2019;209:108275.
33. Counoupas C, Pino P, Stella AO, Ashley C, Lukeman H, Bhattacharyya ND, et al. High-Titer Neutralizing Antibodies against the SARS-CoV-2 Delta Variant Induced by Alhydroxyquim-II-Adjuvanted Trimeric Spike Antigens. *Microbiol Spectr.* 23 de febrero de 2022;10(1):e0169521.
34. Zhang RY, Zhou SH, He CB, Wang J, Wen Y, Feng RR, et al. Adjuvant-Protein Conjugate Vaccine with Built-In TLR7 Agonist on S1 Induces Potent Immunity against SARS-CoV-2 and Variants of Concern. *ACS Infect Dis.* 8 de julio de 2022;8(7):1367-75.
35. Ganneru B, Jogdand H, Daram VK, Das D, Molugu NR, Prasad SD, et al. Th1 skewed immune response of whole virion inactivated SARS CoV 2 vaccine and its safety evaluation. *iScience.* 23 de abril de 2021;24(4):102298.
36. Nouri-Shirazi M, Guinet E. TLR3 and TLR7/8 agonists improve immunization outcome in nicotine exposed mice through different mechanisms. *Immunol Lett.* 1 de junio de 2022;246:18-26.

37. Dasari V, Beckett K, Horsefield S, Ambalathingal G, Khanna R. A bivalent CMV vaccine formulated with human compatible TLR9 agonist CpG1018 elicits potent cellular and humoral immunity in HLA expressing mice. *PLoS Pathog.* junio de 2022;18(6):e1010403.
38. Lu W, Cui C, Wang Y, Sun X, Wang S, Yang M, et al. CpG ODN as an adjuvant arouses the vigor of B cells by relieving the negative regulation of surface TLR9 to enhance the antibody response to vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol.* mayo de 2021;105(10):4213-24.
39. Yamamoto T, Masuta Y, Momota M, Kanekiyo M, Kanuma T, Takahama S, et al. A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer FcγR-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection. *Int Immunol.* 15 de febrero de 2019;31(2):81-90.