



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Posibles efectos neurotóxicos de los adyuvantes presentes en las vacunas infantiles

Cristina Graham Martínez

Grau de Biologia

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43197980R

Treball tutelat per Jerònia Lladó Vich, Departament de Biologia.

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Vacuna, adyuvante, neurodegeneración, neurotoxicidad, autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA), neurodesarrollo.

Agradecimientos

En el presente querría expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que, con su colaboración directa o indirecta, han contribuido a la realización de este Trabajo Final de Grado:

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, la Dra. Jerònia Lladó Vich, su paciencia, consejos y ayuda. Tras muchos meses de dudas, correos y tutorías, siempre ha tenido un momento para escuchar mis preguntas y ayudarme con todo lo que estaba en su mano. Agradezco enormemente las horas que me ha dedicado aun teniendo tantas otras cosas que requerían su atención.

Agradecer a todo el equipo del Dr. Tòfol Vives Bauzà, del departamento de neuro del IdISPa por su apoyo y consejos para la elaboración del trabajo, sobretudo en la recta final.

A mi familia y amigos, por aguantar mi mal humor y mis nervios cuando las cosas no salían y el tiempo se acababa.

Por último, agradecer a la Dra. Ana Castelló Ponce, que me ha visto crecer personal y profesionalmente y aún en la distancia, siempre me ha apoyado y aconsejado, haciéndome ver que el secreto está en el trabajo y en las ganas.

¡Muchas gracias!

Resumen

Las enfermedades infecciosas siguen siendo la causa más común de mortalidad en humanos, y por ello a día de hoy se sigue luchando para conseguir una implementación de la vacunación universal. Los adyuvantes de las vacunas, como el aluminio, han permitido aumentar la eficacia de estas elevando la inmunogenicidad, es decir, la capacidad del sistema inmunitario de reaccionar frente a un patógeno que por sí solo no era suficientemente inmunoestimulador. Estos compuestos junto con preservantes como el tiorosal, han sido objeto de investigación, y en ocasiones relacionados con un mayor riesgo a padecer enfermedades neurodegenerativas y del comportamiento debido a que no son completamente inocuas, aunque sus beneficios son superiores a los posibles riesgos. En este estudio se quiere evaluar la situación de estos compuestos en la actualidad e intentar esclarecer si realmente existe esta relación nociva o no. El resultado ha sido que no existen pruebas suficientes para afirmar que la vacunación con adyuvantes aumenta el riesgo a padecer trastornos neurodegenerativos y del neurodesarrollo.

Abstract

Infectious diseases remain the most common cause of death in humans, and for this reason we are still working towards the implementation of universal vaccination. Vaccine adjuvants such as aluminium compounds have increased the effectiveness of vaccines raising immunogenicity, i.e. the capacity of the immune system to react against a pathogen that did not have sufficient immune-stimulatory capacity by itself. These compounds together with preservatives such as thimerosal have been targeted for investigation and are sometimes associated with an increased risk of developing behavioural and neurodegenerative diseases. This is due to the fact that they are not completely harmless although their benefits outweigh possible risks. This study sets out to assess the current status of these compounds in terms of safety, trying to clarify whether the correlation between vaccines and neurological disorders is real or not. The results of this study show that there is insufficient evidence to suggest that adjuvant containing vaccines increase the risk of developing neurodegenerative and neurodevelopmental disorders.

Índice

Introducción	7
Objetivos y metodología	10
Situación y uso actual de los adyuvantes	12
Compuestos más utilizados en las vacunas y su problemática	14
• Adyuvantes con base de aluminio	17
• El mercurio como conservante	18
• El uso de emulsiones <i>oil-in-water</i>	20
Nuevas estrategias en el diseño de vacunas	21
• Los adyuvantes liposomales	22
• El uso de saponinas	23
• Desarrollo de vacunas no convencionales	23
• Adyuvantes alternativos que están siendo investigados	24
Discusión	25
• Beneficios conocidos del uso de vacunas	26
• Riesgos de administrar vacunas con adyuvantes	28
• Evidencias sólidas de la neurotoxicidad de los adyuvantes	29
Conclusión	30
Bibliografía	30

Abreviaciones

AAT: Antígeno Asociado a Tumores

ADD/ADHD: Síndrome del Déficit de Atención

ADN: Ácido Desoxi Ribonucleico

AEP: Asociación Española de Pediatría

AI/AIFD: Autoimmune/
Autoinflammatory

Al: Aluminio

APC: Célula Presentadora de Antígenos

ASD: Autism Spectrum Disorder

ASIA: Autoimmune (Auto-inflammatory)
Syndrome Induced by Adjuvants

CDC: Centers for Disease Control and
prevention

CK: Creatina Quinasa

CS: Chitosan

DT: Toxina Diftérica

DTP: Difteria, Tétanos, Pertussis

EEUU: Estados Unidos

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EMA: Agencia Europea de
Medicamentos

EtHg: Etilmercurio

FCA: Complejo Adyuvante de Freund

FDA: US Food and Drug Administration

GBS: Síndrome de Guillain-Barré

GWS: Síndrome de la Guerra del Golfo

Hg: Mercurio

HMC: Complejo Mayor de
Histocompatibilidad

HPV: Virus del Papiloma Humano

IFA: Adyuvante Incompleto de Freund

IFN: Interferon

IL: Interleucina

LPS: Lipopolisacárido

MACD: Disfunción Cognitiva Asociada a
la Miofascitis Macrofágica

MeHg: metilmercurio

MMF: Miofascitis Macrofágica

MPL: Monophosphoryl lipid A

NSCLC: Cáncer de Pulmón No
Microcítico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PADRE: T-helper Pan HLA-DR epitope
peptide

pIC: ácido poliinosínico-policitidílico

PRR: receptores de reconocimiento de
patrones

SA: Sistema Adyuvante

SNC: Sistema Nervioso Central

SPR: Sarampión, Paperas, Rubeola

TLR: Toll-like receptor

TNF: Factor de Necrosis tumoral

TT: Toxina Tetánica

VIH: Virus de Inmunodeficiencia
Humana

Introducción

El descubrimiento de la primera vacuna se suele asociar a Edward Jenner, médico inglés que a finales del siglo XVIII consiguió que el trabajo de muchos de sus predecesores como Lady Montagu o Benjamin Jetsy tuviera recompensa con la vacuna contra la viruela (Gross et al., 1998). La vacunación es la mejor prevención para las enfermedades infecciosas según la Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ya que permite el ahorro de millones de euros en tratamiento de enfermedades, además de salvar miles de vidas (CDC, 2011). Estas han permitido la erradicación de la viruela y además han reducido el número de muertes por enfermedades como la tuberculosis, rabia, difteria y poliomielitis (OMS, 2015).

Los adyuvantes en las vacunas han permitido aumentar su eficacia elevando la inmunogenicidad, es decir la capacidad del sistema inmunitario de reaccionar frente a un patógeno que por sí solo no tiene suficiente capacidad inmunoestimuladora. El descubrimiento de los adyuvantes fue alrededor de 1930 donde de forma paralela el veterinario Gaston Ramon y el inmunólogo Alexander Glenny vieron cómo había sustancias como las sales de aluminio que tenían un efecto inmunopotenciador (Glenny et al., 1931). La inmunogenicidad del patógeno ha ido disminuyendo en las vacunas modernas debido a que se ha purificado, de forma que ya no es un patógeno atenuado sino subunidades de éste, como sus antígenos (Figura 1), y, por tanto, produce menos reacción en el cuerpo humano. Esto se demostró en un estudio con el virus H5N1, donde al usar partículas víricas se perdía la señalización Toll-like receptor (TLR) responsable del reconocimiento de patógenos y activador del sistema inmune innato (Geeraedts et al., 2008).

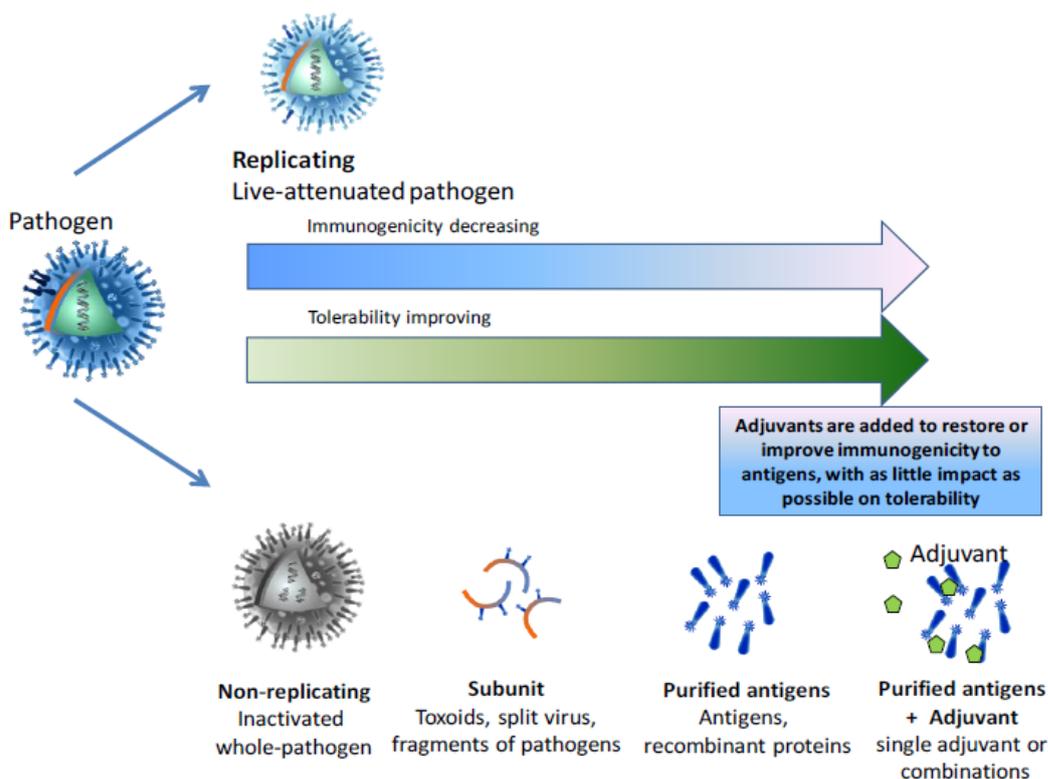


Figura 1. Las vacunas se clasifican en función del agente infeccioso utilizado para la preparación. Estos pueden ser vivos atenuados, inactivados, subunidades, antígenos o una combinación de antígenos purificados con adyuvantes (Di Pasquale et al., 2015).

Además, estas proteínas aumentan la actividad de las células dendríticas, macrófagos y linfocitos y estimulan la producción de anticuerpos (Figura 2). Es por esto que se dice que los adyuvantes aumentan la reacción local frente a los antígenos e inducen la liberación de quimiocinas y citocinas por parte de mastocitos y células T-helper (Shoenfeld et al., 2011). Otro efecto potenciador que tienen los adyuvantes es la translocación de antígenos a los nódulos linfáticos cercanos, favoreciendo la producción y activación de los linfocitos T y B para que la respuesta inmune sea más eficaz.

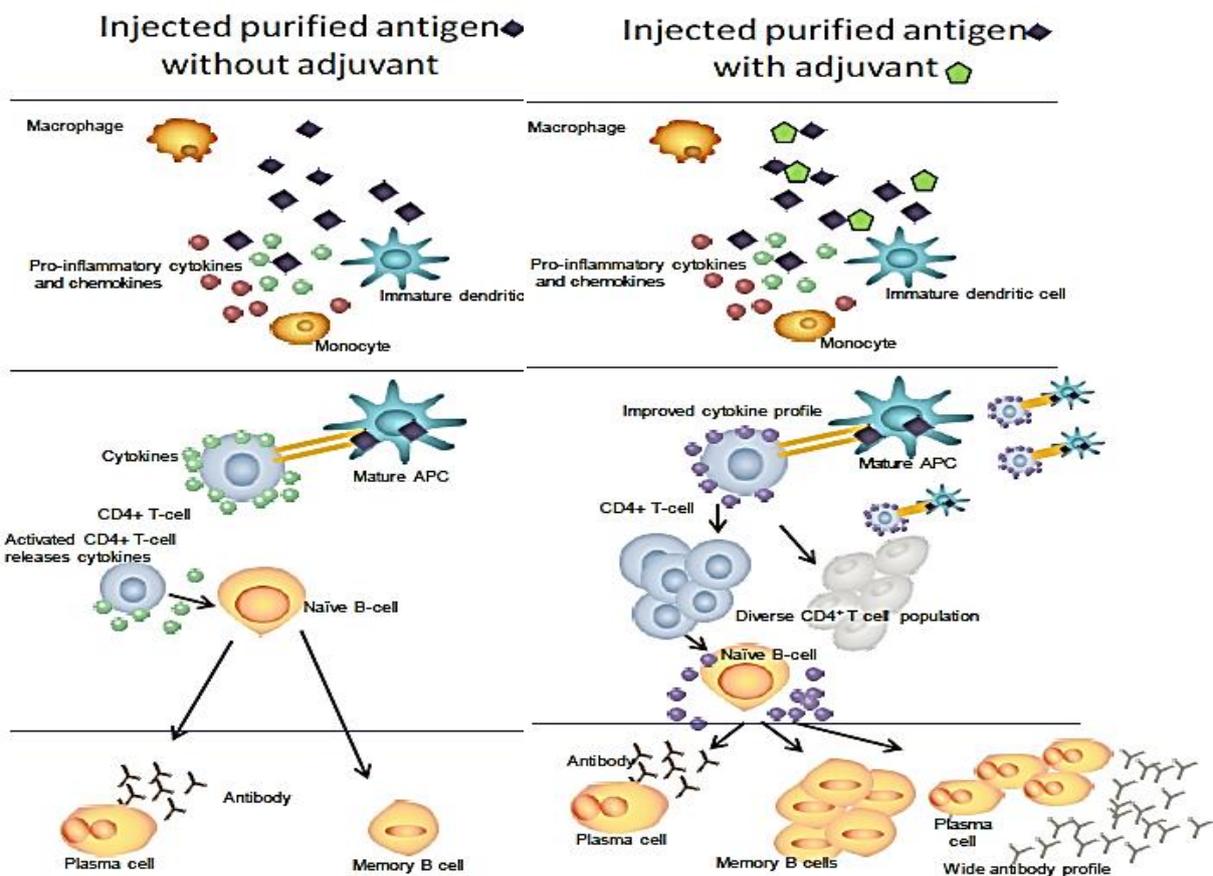


Figura 2. Efecto que producen las vacunas en el sistema inmunitario cuando estas contienen adyuvantes y cuando únicamente contienen preparado antigénico. El adyuvante mejoraría la respuesta de los linfocitos B, aumentando la producción de anticuerpos y de células de memoria. Estas características hacen que sea un candidato perfecto para generar una buena memoria inmunitaria y por tanto de gran utilidad en las vacunas (Di Pasquale et al., 2015 modificado).

Los adyuvantes aumentan la efectividad del sistema inmune innato imitando moléculas antigénicas muy conservadas evolutivamente como las que forman las paredes bacterianas. En particular, la presencia de adyuvantes incrementa el número de anticuerpos y la duración de la respuesta inmune, modifica el balance de linfocitos T helper e induce una respuesta anamnésica (De Becker et al., 2000). Los adyuvantes se unen a TLRs, unas proteínas transmembrana que reconocen agentes

infecciosos y estimulan respuestas inflamatorias. Además de los efectos demostrados en los estudios mencionados anteriormente, se ha visto que los antígenos con base peptídica son menos inmunogénicos debido a que presentan un Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HMC) de reconocimiento limitado (Lanzavecchia, 1993). Esto hace que sea imprescindible desarrollar nuevos compuestos que ayuden a amplificar el efecto del sistema inmunitario ante un patógeno para conseguir vacunas más eficaces.

Los adyuvantes usados con más frecuencia son las sales de aluminio, el pIC o poly I:C (ácido poliinosínico-policitidílico) y las emulsiones "oil-in-water" como el escualeno o el MF59®, ya que numerosos estudios han demostrado que son inocuos para el cuerpo humano (Correia-Pinto et al., 2015) pero a la vez tienen esta capacidad inmunoestimuladora. El más común es el aluminio (usado en forma de sales de aluminio) donde inmediatamente después de su inyección se manifiestan patrones relacionados con las situaciones de peligro como la liberación de ácido úrico. El ácido úrico forma cristales que son fagocitados por células e interrumpen la actividad lisosómica, provocando la liberación de moléculas que activan el sistema inflamatorio intracelular y que por tanto terminan con la producción de anticuerpos, linfocitos T y B (Kool et al., 2008).

Pero no solo hay estudios que remarquen los beneficios de los adyuvantes en las vacunas, sino que también hay bibliografía que desestima estos estudios y exponen los efectos perjudiciales del uso de estos componentes (Shaw et al., 2009), relacionándolos con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas u otros como el síndrome de la miofascitis macrofágica (MMF). Algunos estudios han demostrado que los adyuvantes por sí solos son capaces de provocar enfermedades autoinmunes y por esto destacan la necesidad de crear adyuvantes más seguros (Israeli et al., 2009). Parece ser que el efecto potenciador del sistema inmunitario sería el causante de provocar ciertas enfermedades autoinmunes o auto-inflamatorias (AI/ AIFD) como el Síndrome de la Guerra del Golfo (GWS), la MMF o la siliconosis (formación de granulomas por compuestos como siliconas). Además, los fenómenos de post vacunación comparten síntomas como la inflamación y la fiebre, lo cual parece indicar un denominador común. El desencadenante de todas estas afecciones podrían ser los componentes de los adyuvantes (siliconas, sales de aluminio o agentes infecciosos) y es por esto que estas patologías se englobaron en un único síndrome denominado ASIA, Autoimmune (Auto-inflammatory) Syndrome Induced by Adjuvants (Shoenfeld et al., 2011).

Una de las enfermedades que se ha relacionado con la administración de adyuvantes de aluminio (en este caso concreto con la vacuna del Anthrax) es el Síndrome de la Guerra del Golfo (GWS). Sus manifestaciones clínicas son muy parecidas a las de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) debido a que afecta a las motoneuronas, pero varía en la edad de aparición de los síntomas, mayores de 45 años en ELA y menores de 45 en GWS. La causa podría ser el hidróxido de aluminio, que induce la apoptosis de las motoneuronas, un aumento de astrocitos reactivos y una proliferación de células de la microglía en la médula espinal y en la corteza, capaces de provocar la neurodegeneración. Además de estos resultados, se observaron proteínas tau hiperfosforiladas, al igual que ocurre en otras enfermedades

neurológicas como el Alzheimer (Shaw et al., 2009). La neurotoxicidad demostrada del hidróxido de aluminio en cultivo celular y su ubicuidad relativa como adyuvante sugieren que es necesaria una investigación más profunda de los efectos del aluminio en diversas formas y concentraciones y su efecto también a largo plazo.

El aluminio como adyuvante ha sido asociado a otra afección de post vacunación muy importante, la MMF. Este síndrome es causado por la deposición de aluminio en los macrófagos de los músculos provocando síntomas como mialgias, debilidad muscular, fatiga crónica, artralgia y en algunos casos un trastorno desmielinizante. Además, se producen cambios en la sangre como una elevada creatina quinasa (CK) o un cambio en la velocidad de sedimentación de los eritrocitos (Gherardi et al., 2001), indicadores de lesión muscular o cerebral. Se llegó a la conclusión de que la MMF se da sobre todo en casos donde las personas son susceptibles genéticamente, portadoras del receptor HLA-DRB1 *01 y que por tanto se ven más afectadas por el contenido en aluminio de las vacunas (Guis et al., 2002). Otro efecto que se ha visto es la disfunción cognitiva asociada a la MMF, conocida como MACD, manifestándose en forma de síndrome disejecutivo, en la memoria visual y en la mala audición del oído izquierdo (Couette et al., 2009). En un estudio reciente se revisó de forma retrospectiva la evolución del MACD en 30 pacientes, ya que se considera al MACD como una enfermedad estable en el tiempo, tanto en su desarrollo como en su gravedad a largo plazo. En este, se pudo observar una marcada fluctuación de la gravedad de la enfermedad por lo que la mejoría del estado del paciente ya no parece imposible (Elodie Passeri et al., E 2011).

Otro componente que ha tenido mucha repercusión es el tiomersal, un preservante que se usa desde los años 30 y que hace 15 años se descubrió que provocaba alergia al contacto. Se trata de un agente antiséptico y antifúngico que evita los efectos nocivos que podrían causar vacunas contaminadas de forma accidental por otros agentes infecciosos. Recientemente se ha expuesto su posible influencia en el desarrollo del sistema nervioso central infantil (Dórea, 2011) debido al componente etilmercurio, producto que resulta de la metabolización del tiomersal y que ha causado preocupación por un posible efecto sobre el desarrollo neurológico infantil. Un estudio epidemiológico llevado a cabo en EEUU demostró que había un aumento relativo del riesgo a padecer autismo, retraso mental y trastornos del habla tras la inoculación con la vacuna con tiomersal en comparación con la vacuna sin tiomersal. También se observó que los efectos eran mucho más frecuentes en hombres que en mujeres, 17:1 en autismo y 2.3:1 en trastornos del habla, pero no en el caso de retraso mental, 1.2:1. También se pudo observar como no había diferencia entre vacunas con o sin tiomersal a la hora de desarrollar efectos adversos producidos por la vacunación en sí, como gastroenteritis, vasculitis, convulsiones e incluso la muerte (Geier, 2003).

Objetivos y metodología

El objetivo de este trabajo es el de realizar una revisión bibliográfica de las investigaciones existentes sobre el efecto de los adyuvantes en el sistema nervioso

para intentar obtener una conclusión sobre la seguridad de los adyuvantes en las vacunas infantiles. Para ello se ha realizado una revisión bibliográfica de numerosos estudios donde se busca una posible relación entre el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas o que impidan el neurodesarrollo infantil con el uso de adyuvantes en las vacunas.

CALENDARIO DE VACUNACIONES DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PEDIATRÍA 2016 Comité Asesor de Vacunas										
VACUNA	Edad en meses						Edad en años			
	2	3	4	5	6-7	12	13-15	2-4	6	11-12
Hepatitis B ¹	HB		HB			HB				
Difteria, tétanos y tosferina ²	DTPa		DTPa			DTPa			Tdpa	Tdpa
Poliomielitis ³	VPI		VPI			VPI			VPI	
Haemophilus influenzae tipo b ⁴	Hib		Hib			Hib				
Neumococo ⁵	VNC		VNC			VNC				
Meningococo C ⁶			MenC			MenC				MenC / MenACWY
Sarampión, rubeola y parotiditis ⁷						SRP		SRP		
Varicela ⁸							Var	Var		
Virus del papiloma humano ⁹										VPH 2 dosis
Meningococo B ¹⁰		MenB		MenB	MenB		MenB			
Rotavirus ¹¹	RV		RV		RV					
Gripe ¹²						Gripe (anual)				
Hepatitis A ¹³						HA 2 dosis				

 Sistemáticas financiadas
 Sistemáticas no financiadas
 Vacunas para grupos de riesgo

Vacunas	2m	4m	6m	12m	18m	3a	6a	12a	14a
Hepatitis B	HB	HB	HB						
Difter. Tét. Tos	DTPa	DTPa	DTPa		DTPa		Tdpa		Td
Polio inyectable	VPI	VPI	VPI		VPI				
Haemoph. infl. b	Hib	Hib	Hib		Hib				
Meningococo C		MenC ¹		MenC				MenC	
Triple vírica				SRP		SRP			
Varicela								Var ²	
Papilomavirus									VPH ³

Figura 3. En la primera tabla se observa el calendario recomendado actualizado (2016) de vacunación infantil a nivel estatal. La segunda tabla corresponde al calendario de vacunación de las Islas Baleares actualizado a Julio de 2014. Las competencias para decidir qué vacunas son recomendables y cuáles no, no las tiene el Estado, sino que varían de una Comunidad Autónoma a otra y de un año a otro. Un ejemplo de esto sería que la tercera dosis de recuerdo de varias vacunas ya no se recomienda a los 6 meses, sino que se recomienda a los 12. Además, se incluyen dos vacunas recomendadas no financiadas por el estado, la del rotavirus y la del Meningococo B (AEP, 2016).

Se ha propuesto que la forma más adecuada podría ser que las vacunas se administraran en todas las escuelas eliminando así filtros étnicos, económicos o

sociales, pero el hecho de que haya colectivos que decidan no vacunar a sus hijos ha producido brotes de enfermedades prevenibles con el calendario de vacunación (Figura 3) (López Hernández et al., 2010). Un estudio reciente se propuso averiguar las razones por las que algunos padres no querían vacunar a sus hijos y se encontró que muchos estaban mal informados, sobre todo en cuanto a los beneficios que han aportado las vacunas (Martínez-Diza et al., 2014).

Metodología

Con el objetivo de realizar una búsqueda de información lo más fiable, verídica y representativa de forma simultánea, se ha llevado a cabo una selección de información que contiene obras de referencia, reviews actuales y trabajos muy recientes que permiten dar veracidad o refutar noticias actuales.

Para ello se ha usado la base de datos Pubmed, buscando palabras clave como "Adjuvant vaccine safety", "Adjuvant vaccine toxicity", "ASIA", "vaccine neurotoxicity", y "neurodegeneration due to vaccines". A la hora de profundizar en los temas se han realizado búsquedas más específicas como enfermedades o compuestos en concreto. Se ha decidido realizar la búsqueda en inglés debido a que la mayoría de los artículos se encuentran en este idioma, sobre todo los que han sido citados un mayor número de veces y que por tanto se consideran más importantes. Además de usar estos buscadores se ha consultado el apartado referente a adyuvantes de páginas de organizaciones reconocidas a nivel mundial como la FDA (Food and Drug Administration), la OMS (Organización Mundial de la Salud), la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y la AEP (Asociación Española de Pediatría).

Situación y uso actual de los adyuvantes

Como se ha comentado anteriormente, la situación actual en España es bastante permisiva en cuanto a que la vacunación no es obligatoria y la recomendada varía de una comunidad autónoma a otra, y en muchos casos de un año a otro. La ley que rige este tema es la 41/2002 del 14 de noviembre, donde se deja a libre elección del ciudadano a hacer lo que quiera con su cuerpo. Como se observa en la tabla 1, de las 13 vacunas que recomienda la Asociación Española de Pediatría, 8 contienen adyuvantes y 5 no los contienen. De estos 8, todos tienen compuestos de aluminio, 5 de ellos hidróxido de aluminio, otro fosfato de aluminio y el resto varían de compuesto pudiendo contener hidróxido o fosfato de aluminio dependiendo de la empresa farmacéutica. La vacuna del virus del papiloma humano sería el caso más diferente, teniendo como adyuvante un compuesto *oil-in-water* en algunas marcas como Cervarix®. De los que no contienen adyuvantes, algunos contienen excipientes azucarados como la lactosa, el sorbitol o la sacarosa que sirven de estabilizantes de las vacunas. Otras vacunas también tienen compuestos como el formaldehído, que, aunque en exceso es un agente cancerígeno, en pequeñas cantidades sirve para inactivar virus y desintoxicar las toxinas bacterianas. Un hecho destacable es que de estas 13 vacunas ninguna contiene mercurio, debido a un cambio que se ha llevado a cabo en las costumbres de vacunación, favoreciendo el uso de viales unidosis en

detrimento de los viales multidosis. En 2002, la FDA estimó que, aunque la cantidad de mercurio que contenían ciertas vacunas fuera poco, era evitable si se usaban viales unidosis (Hessel, 2002; FDA, 2015), y tanto EEUU como Europa decidieron decantarse por el cambio, provocando que en estas zonas prácticamente no existan vacunas con tiomersal hoy en día. Por último, destacar que, de estas 13 vacunas, en dos de ellas existen variantes donde la empresa farmacéutica ha decidido usar virosomas en lugar de compuestos con aluminio como potenciadores inmunogénicos.

Tabla 1. Listado de vacunas recomendadas en España clasificadas por el adyuvante que contienen y el tipo de vacuna según su componente antigénico.

Vacuna	Adyuvante	Tipo de vacuna
Hepatitis A	Aluminio y una marca usa virosomas	Atenuada
Hepatitis B	Aluminio	Inactivada
Meningococo C	Aluminio (dos marcas no usan)	Purificada
Meningococo B	Hidróxido de aluminio	Purificada
Varicela	Sin adyuvante. Contiene sorbitol	Atenuada
Poliomielitis	Hidróxido de aluminio	Inactivada
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Sin adyuvante. Contiene lactosa y sacarosa	Inactivada
Neumococo	Fosfato de aluminio	Purificada
Sarampión + rubeola + parotiditis	Sin adyuvantes	Atenuada
Virus papiloma humano	Aluminio y ASO4	Purificada
Rotavirus	Sin adyuvante, contiene sacarosa como aditivo	Atenuada
Gripe	Sin adyuvante (1 marca usa virosomas)	Inactiva, purificada o atenuada
Difteria + tétanos + tos ferina	Hidróxido de aluminio	Purificada

Como se puede observar, existe una gran diversidad de tipos de vacunas, aunque debido a los avances tecnológicos cada vez se tiende al desarrollo de vacunas purificadas debido a que parecen ser más seguras por tener menos partículas antigénicas que potencialmente causen la enfermedad. Buenos ejemplos serían el sarampión, la rubeola y la parotiditis como atenuados, las vacunas de antígenos purificados donde únicamente se usan los toxoides de estos patógenos (difteria, tétanos) o algunos de sus componentes antigénicos como polisacáridos de la cápsula (meningococos) o de subunidades víricas (hepatitis B).

Las vacunas vivas atenuadas son eficaces debido a que inducen una infección leve además de producir una respuesta inmune que es muy similar a la inducida por la infección con cepas de tipo salvaje, por lo que estas vacunas son capaces de iniciar la inmunidad innata, que impulsan las respuestas de adaptación posteriores que darán lugar a la eliminación del patógeno. Algunas vacunas de patógeno inactivado han tenido éxito debido a que contienen una mezcla heterogénea de diversos antígenos y otros componentes de patógenos que actúan como adyuvantes intrínsecos. Sin embargo, este tipo de vacunas no son adecuados cuando la propia infección natural no puede transmitir la inmunidad a largo plazo (para lo que se recomiendan dosis de recordatorio), o cuando el patógeno es incapaz de crecer en cultivo. En estos casos se debe añadir un adyuvante al preparado para que sea más eficaz en su tarea de activar el sistema inmune. Las vacunas más típicas que contienen adyuvantes son las de Pertussis (P), Tétanos (T), Difteria (D), Hepatitis A, Pneumococo conjugado y Meningococo conjugado, virus del papiloma humano, cáncer de Pulmón No Microcítico (NSCLC) y la gripe.

Las vacunas con patógenos vivos (como los atenuados) no pueden contener tiomersal debido a que éste es un antibiótico y antifúngico por lo que mataría al patógeno contra el que se quiere crear anticuerpos. Es por esto que las vacunas que pueden contener tiomersal son los que contienen antígenos de D, T y P, las vacunas contra la hepatitis B, contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y contra la gripe, porque son inactivadas o purificadas. Los conservantes como este evitan el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes que se pueden introducir durante el uso repetido de los viales multidosis. La OPS (Organización Panamericana de Salud) recomienda que una vez abierto el frasco multidosis sea utilizado en un periodo máximo de cuatro semanas. Para su conservación, se puede liofilizar (tratamiento de congelación y envasado al vacío) o se puede añadir un componente como el tiomersal.

Compuestos más utilizados en las vacunas y su problemática

Los adyuvantes pueden ser divididos en dos categorías (Figura 4), los primeros serían los vehículos de antígenos, tales como emulsiones y liposomas, que presentan los antígenos al sistema inmunológico de una manera más eficiente y prolongan la liberación de antígenos para aumentar las respuestas inmunes específicas. La segunda categoría de adyuvantes son los inmuno-estimulantes, como agonistas del TLR, el hidróxido de aluminio, las saponinas y las citocinas.

Entre los 24 ejemplos específicos de adyuvantes que se destacan en la Directriz de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), muchos aparecen como formulaciones de varios adyuvantes. Únicamente seis tipos de adyuvantes han sido autorizados para el uso en vacunas humanas o están a punto de serlo; las sales de aluminio, emulsiones, virosomas, componentes como el Monophosphoryl lipid A (MPL), inmunomoduladores endógenos y las partículas inertes como el oro. Los más utilizados

son los compuestos con base de aluminio, seguidos de las emulsiones *oil-in-water*. Recientemente se han empezado a usar adyuvantes con una estructura liposomal como parte de su formulación, concretamente, los virosomas y el sistema adyuvante AS01. El primer virosoma que se desarrolló fue IRIV (Immuno Reconstituted Influenza Virosomes), y realmente es un liposoma biodegradable que contiene varias sustancias que se sabe que contribuyen a conseguir una mejor eficacia de los adyuvantes. Esto se debe a que en su superficie se expresan las glucoproteínas haemaglutinina y neuraminidasa del virus de la influenza H1N1, además de servir como transportador.

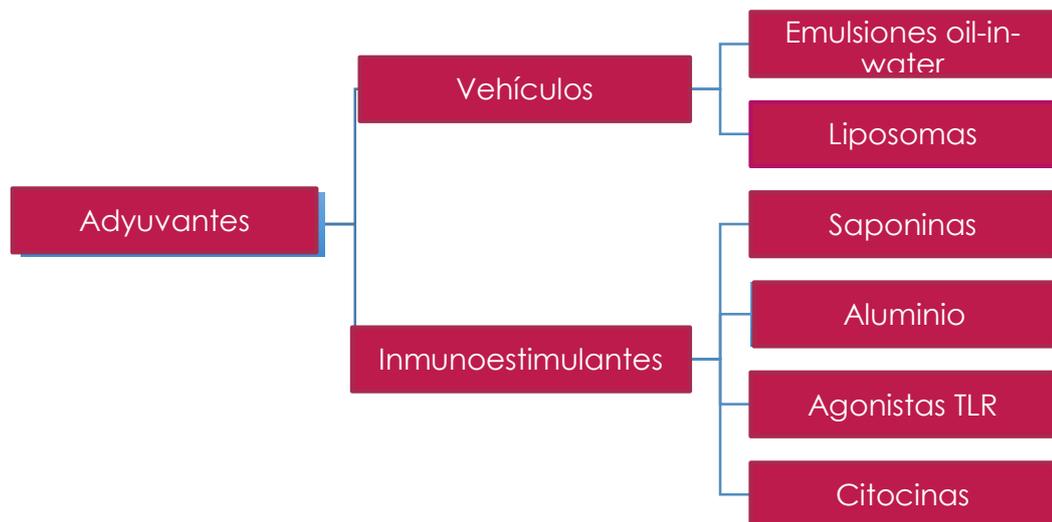


Figura 4. Representación esquemática de los tipos de adyuvantes donde podemos observar dos categorías; vehículos e inmunoestimulantes. La primera son los que tienen función vehicular por lo que su función básicamente es mejorar la presentación del antígeno para mejorar la respuesta inmunitaria del cuerpo. La segunda categoría incluye los compuestos que directamente aumentan la respuesta inmunitaria del cuerpo.

Los adyuvantes pueden ejercer sus efectos a través de diferentes mecanismos tal y como se muestra en la figura 5. Los compuestos de aluminio y emulsiones (por ejemplo, MF59®), funcionan como sistemas de suministro mediante la generación de depósitos que atrapan a los antígenos en el sitio de inyección, proporcionando una liberación lenta de estos antígenos con el fin de continuar la estimulación del sistema inmune. Estos adyuvantes aumentan el reclutamiento y la activación de células presentadoras de antígeno (APCs). El aluminio tiene la capacidad de unirse a antígenos para formar agregados multimoleculares que estimulan su captación por las APC. Otra función del MF59® o de otros adyuvantes como el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) es la de dirigir la presentación de antígenos mediante los HMC, afectando a la presentación de antígenos y haciendo más efectiva la respuesta inmunitaria.

Otros adyuvantes, sobre todo ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los TLR, actúan mediante la inducción de la inmunidad innata, principalmente dirigidos a las APC y por lo tanto influyen en la respuesta inmune adaptativa. Estos funcionan a través de vías de señalización que conducen a la activación de diferentes factores de transcripción que inducen la producción de citocinas y quimiocinas. Así como se observa en la figura 5, la activación de algunos miembros de la familia NLR (un sistema similar al TLR), provocan la formación de un

complejo proteico denominado inflamasoma, y que está implicado en la inducción de las citocinas pro-inflamatorias (Leroux-Roels, 2010).

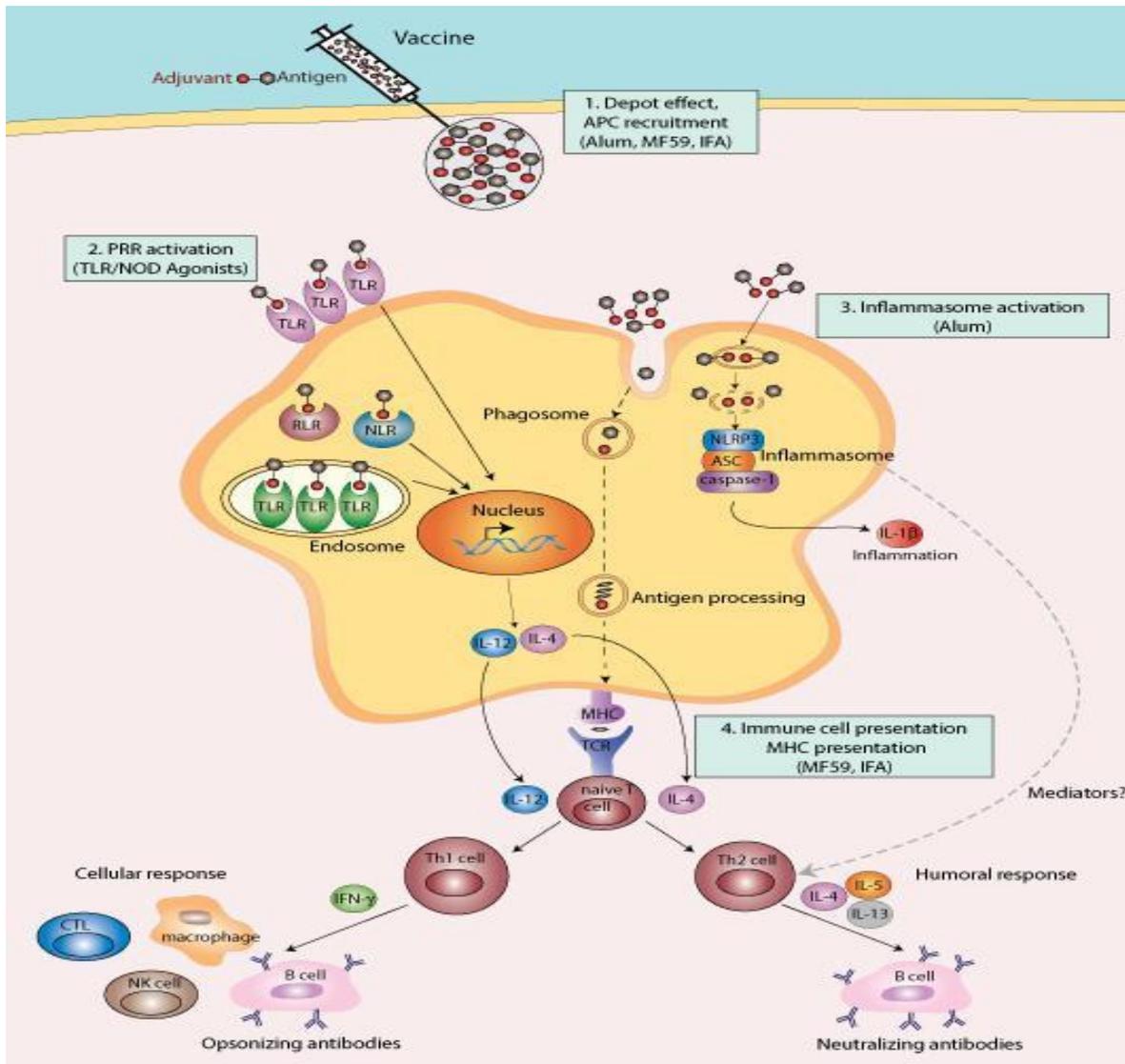


Figura 5. Efecto de los principales adyuvantes sobre el sistema inmunitario. Estos mecanismos pueden incluir cambios en el núcleo mediante factores de transcripción o pueden ser mecanismos externos al núcleo, como la presentación del antígeno en la superficie celular o el papel del inflamasoma. Finalmente, los linfocitos T helper inducirán una respuesta humoral y celular que permitirán crear anticuerpos capaces de neutralizar y opsonizar, respectivamente (Invivogen, 2011).

Por último, cabe destacar el papel de las células T helper (Th1 y Th2), que liberan citocinas que activan a los linfocitos B, provocando su diferenciación en células de memoria o en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Las Th1 secretan interferón (IFN- γ), que activa macrófagos, activa los LTC (linfocitos T citotóxicos) y los NK (natural killer) e induce la producción de anticuerpos opsonizantes (respuesta celular). Mientras, las Th2 secretan citocinas, que inducen a las células B a producir anticuerpos neutralizantes (respuesta humoral).

Adyuvantes con base de aluminio:

El adyuvante más usado es el aluminio, tanto en forma de hidróxido de aluminio como en forma de sales de aluminio. Los compuestos conocidos como "alum" son realmente sulfatos de potasio aluminio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) y no sirven únicamente para potenciar la respuesta inmune, sino que también sirven como purificadores de las partículas proteicas antigénicas como la toxina tetánica (TT) o la toxina diftérica (DT) precipitándolas en presencia de aniones, y resultando en fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio (Gupta et al., 1995). Esto es debido a que se ha descrito que el aluminio aumenta la producción de anticuerpos (Figura 2), haciendo que sean ideales en este sentido para vacunas que matan patógenos e inútiles contra patógenos intracelulares. El problema es que a la vez suscita fuertes respuestas humorales en el sistema inmune, lo que algunos estudios han relacionado con la aparición de enfermedades como el autismo, la GWS o la MMF. Es por esto que es de los adyuvantes más estudiados, por su conocida toxicidad en elevadas concentraciones y por lo que se somete a estudio su posible acumulación en tejidos tras los episodios de vacunación. Una investigación de la FDA encontró que la cantidad máxima de aluminio que un bebé podría tolerar a lo largo del primer año de vida sería de 4.225 mg, recibiendo como máximo 1.25 mg de aluminio por dosis. Por ejemplo, la cantidad de aluminio en la vacuna de la hepatitis B, que se administra al nacer en EEUU, es de 0,25 mg, por lo que la cantidad es muy inferior a la cantidad máxima recomendada por la FDA (Keith et al., 2002).

Posibles efectos tóxicos del aluminio sobre el SNC

Debido al uso extendido del aluminio como adyuvante, numerosos estudios han probado si podría tener efectos neurotóxicos que afectaran al desarrollo del SNC (Sistema Nervioso Central). Como este compuesto forma aglomerados micrométricos, en personas susceptibles es capaz de provocar ASIA. En un estudio llevado a cabo por Khan et al., (2013) se observó cómo tras la inyección se formaban depósitos de aluminio en órganos lejanos como el bazo o el cerebro tras pasar por nódulos linfoides drenantes. Esto indica que el aluminio es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica cuando es administrado intramuscularmente debido a que hay un aumento de CCL2, un quimioatrayente de monocitos. En cambio, se observó que no llegaba al cerebro cuando se inyectaba de forma intravenosa, por lo que se concluyó que posiblemente algunos nanomateriales podían atravesar la barrera hematoencefálica mediante mecanismos CCL2 dependientes, causando alguna de las manifestaciones clínicas de ASIA.

En un estudio llevado a cabo por Bishop et al., (1997) se pudo observar como bebés prematuros que necesitaban ser alimentados de forma intravenosa durante más de 10 días con un preparado que contenía aluminio tenían más del doble de probabilidades de presentar trastornos del desarrollo neurológico. Estos preparados contienen aluminio como oligoelemento necesario para el correcto desarrollo de un bebé, pero muchas marcas contienen cantidades mucho más elevadas de las que se obtendrían por alimentación materna. En un estudio realizado en 1999 por Fernández-Lorenzo et al., se observó que el contenido en aluminio en la leche materna era aproximadamente 23.95 $\mu\text{g/l}$ ($\pm 9.6 \mu\text{g/l}$) mientras que los preparados

comerciales tenían una media de 225.85 µg/l (\pm 216.17 µg/l). Aunque se presupone comúnmente que los niños obtienen mucho más Al por la dieta que por vacunas, esta noción contradice los principios básicos toxicológicos ya que las vías de exposición que evitan las barreras de protección del tracto gastrointestinal y/o la piel es probable que requieran una dosis más baja para producir un resultado tóxico. En este caso, aproximadamente el 0,25% de Al se absorbe en la dieta y pasa a la circulación sistémica mientras que en forma de hidróxido de aluminio (la forma más común en los adyuvantes) al inyectarlo por vía intramuscular se acaba absorbiendo casi con una eficiencia del 100% (Yokel et al., 2008). Esta absorción cerebral provoca que pueda llegar a la corteza entorrinal y la región del hipocampo del cerebro, áreas vulnerables a la degeneración neuronal y que se asocian a la enfermedad de Alzheimer.

Otro estudio relaciona el aluminio con el aumento reciente en la prevalencia del número de casos de autismo o Autism Spectrum Disorder (ASD). En este estudio realizado en países occidentales, exponen que existe una correlación entre el aluminio administrado en vacunas a bebés de 3-4 meses de edad y la prevalencia del ASD (Pearson $r=0.89$, p valor= 0.0248). También demostraron una correlación entre los países con mayor tasa de vacunación con adyuvantes de aluminio y aquellos con mayor prevalencia de ASD en países occidentales y en EEUU. Este incremento fue justificado exponiendo que en los años 70 la recomendación eran 10 vacunas para niños menores de 6 años y que en la actualidad se recomiendan 32, 18 de las cuales contienen adyuvantes de aluminio. Se defiende que en este mismo periodo la prevalencia de ASD en EEUU ha aumentado un 2000% (Tomljenovic et al., 2011).

Para examinar si este compuesto podría contribuir a déficits neuronales asociados a GWS, se desarrolló un modelo animal para examinar los posibles efectos neurológicos del hidróxido de aluminio, escualeno, o la combinación de ambos. Una cohorte de ratones machos jóvenes CD-1 fueron inyectados con los adyuvantes en dosis equivalentes a las que se les daba a los militares (Petrik et al., 2006). Todos los ratones fueron sometidos a una batería de pruebas motoras y cognitivo-conductuales en un periodo de 6 meses posterior a las inyecciones. Tras el sacrificio, se examinaron los tejidos del sistema nervioso central mediante inmunohistoquímica en busca de evidencia de inflamación y muerte celular. Los resultados mostraron efectos tanto a nivel motor, perdiendo un 50% de la fuerza, como cognitivo, cometiendo una media de 4.3 errores en el water-maze en comparación al grupo control que cometía una media de 0.2 errores. Por tanto, se observó que los animales inyectados con los adyuvantes se veían perjudicados frente a los inyectados con el control. A nivel inmunohistoquímico se observó una pérdida de motoneuronas del 35% y un incremento en el número de astrocitos del 350% en la médula espinal lumbar, lo cual evidenciaba una lesión nerviosa importante.

El mercurio como conservante

El mercurio que encontramos en las vacunas se encuentra en forma de etilmercurio y se añade únicamente en algunas ocasiones, en concentraciones de 0,003% a 0,01%. Una vacuna que contiene 0,01% de timerosal como conservante contiene aproximadamente 25 microgramos de mercurio por 0,5 ml de dosis (FDA, 2015).

Debido a su composición a base de mercurio, se ha relacionado también con un mayor riesgo de padecer enfermedades neurológicas como el autismo o el síndrome de déficit de atención.

Hay varias formas en las que los niños pueden entrar en contacto con el mercurio durante su niñez y de esto depende en muchas ocasiones la gravedad de la intoxicación, ya que la ingestión o inhalación será mucho más perjudicial que el contacto cutáneo. El motivo de exposición principal es la comida contaminada, sobre todo el pescado, que contiene metilmercurio. Otra forma descrita recientemente es el vapor de Hg en forma elemental, utilizado en rituales religiosos en zonas del Caribe y una tercera sería a través de cremas y amalgamas dentales. La última forma sería la que encontramos en el tiomersal, como preservante que contiene mercurio en forma de etilmercurio, y que ha demostrado ser igual de tóxico que el metilmercurio en altas dosis, pero sus efectos a bajas dosis siguen siendo un tema controversial. Debido a que el mercurio ha sido relacionado con el incorrecto desarrollo neurológico en algunos niños, es de vital importancia llevar a cabo más estudios como el realizado por Geier (2003) para entender los mecanismos de acción y así calcular su riesgo potencial. Los órganos más afectados por la absorción (inhalación, dérmica u oral) del aluminio son el cerebro y los riñones, y en el caso de la inhalación de Hg⁰, se ven afectados los pulmones, con depósitos de mercurio en macrófagos alveolares (Møller-Madsen, 1991).

Posibles efectos tóxicos del tiomersal sobre el SNC

Se realizaron estudios en cohortes de niños nacidos entre los años 1990-1996 en EEUU que habían recibido la vacuna oral de la polio en los tres primeros meses de vida. Se tuvo en cuenta el sexo, la cohorte anual, la raza y características del parto como las semanas de gestación, el peso del bebé y la edad materna, estudiando 278.624 casos. Se separaron dos grupos, uno en el cual habían recibido vacunas con tiomersal hasta los 7 meses por las dosis de recordatorio y otro grupo que las había recibido hasta los 13 meses. Se realizaron seguimientos durante un mínimo de 5 años y se observó una asociación significativa entre la exposición a mercurio (proveniente del tiomersal) y trastornos neurológicos. Fue especialmente destacable en el caso del síndrome de déficit de atención (ADD/ADHD) con una tasa de 3.15 en los casos de exposición durante 7 meses y 4.51 en los casos de 13 meses, con un p-valor <0.001 (Young et al., 2008), mostrando una diferencia significativa en un 99.9% de los casos.

En otro estudio llevado a cabo en EEUU en dos etapas se evaluó la relación entre vacunas que contenían tiomersal y el riesgo de padecer enfermedades del espectro autista. En la primera fase se miraron los efectos de la vacuna DTP con tiomersal y sin tiomersal en una cohorte de niños nacidos entre los años 1998-2000. Y en una segunda fase se estudiaron las mismas variables, pero sobre una cohorte de niños nacidos entre 1991 y 1999 y con la vacuna de la Hepatitis B. En la fase I los resultados mostraron un mayor número de casos de autismo en niños vacunados con DTP que contenía tiomersal (38) frente al número de casos de autismo en niños con la vacuna DTP sin tiomersal (17). En cada uno de los grupos se administraron unos 15 millones de vacunas por lo que, aunque la prevalencia de la enfermedad era muy baja, la diferencia era significativa con un p-valor < 0.02 (Geier et al., 2013).

Aunque se observen diferencias significativas, estas podrían deberse a otros motivos ya que no se ha demostrado que el tiorosal sea neurotóxico. Para ello es importante destacar la farmacocinética del etilmercurio (EtHg) ya que tiene un tiempo de semivida muy diferente al del metilmercurio (MeHg), que podemos ingerir con alimentos como el pescado. En un estudio realizado con monos, se comprobó mediante muestras de sangre y de cerebro que el tiempo de semivida del EtHg era de 8.6 días mientras que el del MeHg era de 21.5 días. Esto significa que el MeHg permanece durante más tiempo en el cuerpo, lo que podría explicar su toxicidad (Burbacher et al., 2005). Otro detalle importante que se observó fue que había un mayor porcentaje de mercurio elemental en el cerebro cuando se administraba EtHg (34%) que no cuando se administraba MeHg (7%), por lo que el MeHg no es una referencia adecuada para la evaluación de riesgos de la exposición al tiorosal. La conclusión básicamente fue que era necesario conocer la toxicocinética y la toxicidad a largo plazo del tiorosal para permitir una evaluación significativa de sus efectos.

En un estudio posterior con 15 mujeres que padecían del síndrome de fatiga crónica, se les administraba 1 ml cada 3-4 semanas de una vacuna con toxoide de estafilococos y 0,01% de tiorosal. Se escogieron otras 15 mujeres con el mismo diagnóstico para que sirvieran de control y los resultados fueron parecidos a los obtenidos con los monos. La cantidad de EtHg era muy elevada al día siguiente de la inyección en las pacientes tratadas pero los niveles se normalizaban tras unas semanas y se estimó la vida media del EtHg en 5.6 días. Los niveles de MeHg (debidos al consumo de pescado) fueron mucho más elevados que los de EtHg a largo plazo por lo que los resultados indican que el mercurio del tiorosal no se acumula en la sangre en adultos, sino que se metaboliza rápidamente a mercurio inorgánico (Barregard et al., 2011). Esto podría explicar por qué el MeHg tiene efectos neurodegenerativos o que impiden un correcto desarrollo neuronal y en cambio todavía se desconoce si el EtHg podría hacer lo mismo a largo plazo.

El uso de emulsiones *oil-in-water*

Las emulsiones *oil-in-water* son un tipo de adyuvante que actúa de vehículo para mejorar la presentación del antígeno ante los macrófagos. Las convencionales usan varios emulsionantes químicos como Tween 80 y Span 80, pero la seguridad de estos compuestos al ser inyectados intramuscularmente sigue siendo objeto de investigación. La mayoría de ellos están asociados al escualeno, un triterpeno precursor de la biosíntesis del colesterol que se usa como agente protector. Se ha demostrado que disminuye los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia y está siendo estudiado como adyuvante debido a que potencia la respuesta inmunitaria frente a varios antígenos (Reddy et al., 2009). Los más usados son MF59® y AS03, de los cuales se conocen el mecanismo de funcionamiento, y también el AF03, del cual se desconoce el mecanismo.

El **MF59®** es un tipo de emulsión *oil-in-water* que contiene una base de escualeno. Los monocitos, macrófagos y granulocitos son estimulados, produciendo una serie de quimiocinas capaces de atraer monocitos y granulocitos aún más, por lo que se

consigue un mecanismo de retroalimentación (Pellegrino et al., 2015). Según varios estudios el MF59® es un adyuvante seguro (Knuf et al., 2015) que se usa en las vacunas de la gripe y aunque hace casi 20 años que se aprobó su uso para ancianos, recientemente se aprobó su uso con niños.

El **AS03** es un sistema adyuvante (SA) que contiene α -tocoferol (bioforma de la Vitamina E) y escualeno en una emulsión de *oil-in-water*, al igual que el MF59®. Se observó que el compuesto α -tocoferol mejoraba la magnitud de la respuesta adaptativa específica frente al antígeno, disminuyendo el tiempo que tardan en migrar los neutrófilos y eosinófilos a los ganglios linfáticos de drenaje.

Una nueva formulación de *oil-in-water* ha sido creada usando surfactantes (tensioactivos) derivados de plantas, comúnmente utilizados en el procesamiento de alimentos como emulsionantes, para estabilizar una nueva emulsión de aceite en agua, conocido como OW-14. Este compuesto es fácil y barato de obtener, además de que es estable a temperaturas de hasta 40°C. La capacidad inmunogénica de OW-14 demostró ser muy eficaz cuando se combinaba con antígenos enteros inactivados de la gripe porcina y de *Mycoplasma* provocando respuestas de anticuerpos más elevadas y prolongadas que las vacunas comerciales (Gallier-Beckley et al., 2015).

Otro adyuvante del tipo emulsionante fue el Complejo Adyuvante de Freund (FCA) un *water-in-mineral oil* emulsión que no resultó ser muy seguro debido a que el aceite mineral causó una variedad de patologías, incluyendo la formación de granulomas en el sitio de la inyección y, en algunos casos, el desarrollo de tumores (Bingham et al., 1967).

Nuevas estrategias en el diseño de vacunas

En cuanto a la investigación de los efectos de los adyuvantes existentes, sería de gran utilidad estudiar los efectos a largo plazo sobre todo del aluminio (el más común) ya que podría tener una función emergente desconocida que apareciera tras muchos años desde su administración. Además, estudiar los efectos a nivel cognitivo podría dilucidar ciertos mecanismos de degeneración, desconocidos hasta el momento, y ofrecer posibles soluciones a enfermedades que sigan los mismos patrones. Aunque ya hay alternativas al aluminio, este compuesto sigue siendo el más útil debido a que no se han desarrollado adyuvantes que igualen o mejoren su función. Es por esto que la búsqueda de nuevos adyuvantes sigue siendo un campo de investigación muy activo. Por el momento, una solución que se ha propuesto (Israeli et al., 2009) es el uso de otros adyuvantes aprobados más específicos como el MF59® en vacunas virales, AS04 en infecciones virales y parasíticas, la toxina del cólera para la vacuna del cólera, MPL (Monophosphoryl lipid A) para vacunas contra tumores etc. Estos han demostrado ser prometedores debido a que inducen una respuesta inmunitaria en humanos y de momento no se han observado efectos secundarios como los que sí se han observado con el aluminio. Si bien es cierto que la activación del sistema inmunitario por agentes infecciosos es algo común, la aparición de una enfermedad autoinmune no lo es. El efecto adyuvante de las partículas microbianas podría determinar la activación no antigénica de la inmunidad innata y la inmunidad

reguladora, así como la expresión de diversas citocinas reguladoras, y por tanto puede determinar si una respuesta autoinmune sigue siendo limitada e inofensiva o si evoluciona a una enfermedad (Rose, 2010). En 1976 hubo un brote del Síndrome de Guillain-Barré (GBS), tras producirse una campaña de vacunación contra la influenza porcina (CDC, 2015) y se sigue investigando una posible correlación entre estas vacunaciones y ASIA.

En este ámbito se está trabajando mucho con adyuvantes de origen vegetal como las saponinas, además del uso de virosomas o vacunas con DNA. Esto permitiría un reconocimiento que impulsaría la fabricación de anticuerpos específicos, pero sin producir el efecto patogénico en el huésped. Un ejemplo de esto sería el uso de linfocitos T y el Citomegalovirus, que está siendo investigado por Louis Picker del Oregon National Primate Research Center (Hansen et al., 2011). Además, la implementación de vacunas multivalentes específicas pero que sirvieran para varias cepas sería un gran paso para patógenos con una elevada tasa de mutación, como el virus de la gripe, ya que permitiría una cobertura frente a varias cepas y evitaría la necesidad de vacunar cada año. Debido también a que la tecnología y la ciencia avanzan rápidamente es posible ir creando y mejorando vacunas como la del Dengue, que en estos momentos solo es efectiva en un 59.2% de los casos pero que ya así contribuiría a salvar muchas vidas.

Los adyuvantes liposomales

Los liposomas han sido utilizados desde hace años como transportadores de antígenos peptídicos. Los antígenos se quedan en la superficie encapsulados en el espacio acuoso interno. Debido a que los liposomas suelen interaccionar con los macrófagos, se trató de encontrar la manera de usarlos como transportadores de materiales antigénicos y de adyuvantes como el lípido A, la interleucina-1, y la interleucina-2. En estudios in vitro se ha conseguido que los liposomas incluso puedan sustituir a las APC (Alving, 1991). Los liposomas pueden inducir una potente inmunidad in vivo y por ello están siendo utilizados como adyuvantes de numerosas vacunas como la de la tuberculosis.

El lípido A es el constituyente principal de la porción biológicamente activa del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular bacteriana gram-negativa. Se ha descubierto que este compuesto posee fuertes propiedades inmunoestimulantes y se ha evaluado durante más de dos décadas como adyuvante por su capacidad de generar respuestas inmunes a antígenos con capacidad inmunogénica mínima, incluyendo los antígenos asociados a tumores (AAT), alergias y enfermedades infecciosas. El descubrimiento relativamente reciente de TLRs y la identificación de TLR4 como el receptor de señalización para el lípido A ha permitido una mejor comprensión de cómo funciona este inmunoestimulante en la inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa (Cluff, 2009). El MPL (Monophosphoryl Lipid A) está resultando ser prometedor debido a que ya se han usado 33.000 dosis en humanos y todavía no se han reportado efectos secundarios más allá de fenómenos típicos de ASIA. Además, podría significar la creación de vacunas contra cánceres

concretos como el de colon o el de próstata usando antígenos específicos que se sobreexpresan al padecer la enfermedad.

El uso de saponinas

La saponina QS-21 es un adyuvante activador del sistema inmunológico. Proviene de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, y es un triterpeno purificado soluble en agua de carácter anfipático y que por tanto puede ser mezclado con un antígeno y formar una emulsión o quedar solubilizado. Se ha observado que mejora la respuesta inmunitaria en modelos animales tanto en vacunas antigénicas como en aquellas vacunas de DNA, aumentando la producción de citocinas inmunoestimuladoras (Kensil et al., 1998). Existen otras saponinas, pero estas tienen numerosos inconvenientes debido a que algunas han demostrado ser tóxicas y otras han producido efectos hemolíticos al unirse al colesterol de la membrana plasmática. Debido a que este compuesto es sintetizado por numerosas especies de plantas, existen numerosos tipos de saponinas y todavía se están estudiando cuales podrían ser más útiles como adyuvantes (Sun et al., 2009).

Desarrollo de vacunas con dianas no convencionales

Se están barajando nuevos enfoques para desarrollar vacunas más eficaces, específicas y que incluyan varios serotipos para que sirvan contra cepas cambiantes del patógeno (como el de la gripe). Hasta la fecha se han probado vacunas de vectores virales, vacunas DNA, vacunas de células dendríticas y las que más efectivas están demostrando ser aquellas con nuevos adyuvantes.

El primer tipo de nuevas vacunas es el de los vectores virales, los **virosomas**. Se han diseñado para codificar péptidos o antígenos específicos que se insertan en el genoma de virus modificados capaces de infectar células humanas. Durante la multiplicación viral y la infección, estos péptidos son reconocidos por el sistema inmune como señales patogénicas y son procesadas por APCs, activando la respuesta inmune adaptativa. Para ello se ha estudiado el *Vaccinia virus* (virus modificado de Vaccinia Ankara) y los adenovirus (Gilbert, 2013). De las opciones que no incluyen adyuvantes, esta es la que está en estado más avanzado, habiendo alcanzado la fase III en estudios humanos y por tanto se están realizando pruebas sobre miles de pacientes a nivel mundial. El inconveniente de usar estos vectores es que al activar APCs pueden provocar una auto-activación de los linfocitos T, que podrían llevar al desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esto resultaría en que el cuerpo destruiría células sanas vecinas mediante factores liberados como el óxido nítrico o el factor de necrosis tumoral (TNF), que a su vez producirían la liberación de citocinas en el foco de inflamación (Pellegrino et al., 2015).

El segundo tipo serían las **vacunas de ADN**, donde el ADN del plásmido bacteriano se carga con genes que codifican el antígeno de interés. La expresión del antígeno se produce una vez que el plásmido es incorporado en las células huésped. Estas vacunas funcionan mediante la generación del antígeno deseado dentro de las células, con la ventaja de que esto puede facilitar la presentación a través del HMC. Hasta la fecha, las vacunas de ADN han demostrado una inmunogenicidad limitada en los seres humanos y su desarrollo ha sido lento (Khan, 2013).

El tercer tipo serían las vacunas de **células dendríticas**, que ejercen un papel central en la respuesta inmune debido a que de ellas dependerá el tipo de respuesta que se genere. Se trata de infusiones de antígenos de células dendríticas tratadas maduras, (por lo general autólogas) que se infunden en el paciente, y que se utilizan actualmente en el contexto de la terapia oncológica (Mosca et al., 2007) y del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Nueve preparados para una vacuna antitumoral han alcanzado la fase III y uno, el sipuleucel-T®, ya ha sido aprobado para el tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos (Kantoff et al., 2010).

Adyuvantes alternativos que están siendo investigados

Numerosos estudios trabajan para encontrar nuevos adyuvantes, sobretodo enfocados a sustituir los compuestos de aluminio, ya que se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas o auto inmunitarias. Un ejemplo de esto es la policaprolactona, PCL, que se añade al preparado antigénico tetánico y a una proporción muy baja de fosfato de aluminio, reduciendo el contenido de este compuesto de 0.45 mg $AlPO_4$ /0.5ml vacuna a 0.2 mg $AlPO_4$ /0.5ml vacuna. Estas vacunas se experimentaron en ratones y se compararon con la vacuna tetánica normal obteniendo unos resultados prometedores. No solo se consiguió bajar la cantidad de aluminio, sino que el efecto de este preparado provocaba niveles más altos de IFN- γ e interleucina 4 (IL-4). Esto implica que tanto la respuesta humoral como la celular fueron más eficaces, mejorando también la adsorción del antígeno de un 55% a un 95% (Bansala et al., 2015). Esto significa que sería posible desarrollar nuevos adyuvantes capaces de mimetizar o incluso mejorar el efecto potenciador del aluminio, pero sin los efectos tóxicos que este puede producir.

Se han realizado estudios de otros componentes como las nanopartículas de polisacáridos biodegradables como el Chitosan (CS), capaces de asociarse a proteínas y péptidos como antígenos e inmunoestimulantes. El inconveniente del uso de polisacáridos en vacunas es que son poco inmunogénicos y para ello es necesario añadir un análogo viral sintético como el ácido poliinosínico-policitidílico (pIC), agonista del TLR3 presente en los endosomas de las células presentadoras del antígeno. Pero se observó que estos compuestos ocasionaban enfermedades de inflamación crónica y de inmunidad (Cunningham et al., 2007), problemas que han sido relacionados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, debido a que el sistema nervioso central tiene una capacidad muy limitada de regeneración (DeLegge et al., 2008). Aunque todos los adyuvantes han documentado algunos casos de efectos perjudiciales en humanos (Tabla 2), su efecto es tan potente que se siguen utilizando e investigando.

Los estudios más recientes con CS se enfocan en desarrollar un CS con la capacidad de transportar un péptido antigénico con el pIC y un péptido denominado T-Helper Pan HLA-DR epitope peptide (PADRE) que aumenta la respuesta de los linfocitos T helper favoreciendo su maduración. Por el momento, se ha usado este CS con pIC y PADRE como adyuvantes en la vacuna del virus del papiloma humano (HPV), un hecho importante debido a que este antígeno en concreto es muy poco

inmunogénico (Correia-Pinto et al., 2015) y de esta forma la vacuna es mucho más eficaz.

Tabla 2. Tabla resumen de los efectos neurotóxicos que han sido relacionados en varios estudios con la administración de vacunas con adyuvantes.

Adyuvante / preservante	Efectos neurotóxicos observados	Bibliografía que lo apoya
Alum (sales de aluminio e hidróxido de aluminio)	Microgliosis, bajo uso de glucosa y alteración en mecanismos de fosforilación-defosforilación, ASIA	(Shaw et al., 2009) (Shaw et al., 2014)
Emulsiones oil-in-water como MF59®, AF03 y AS03)	ASIA	(Pellegrino et al., 2015)
Virosomas	ASIA	(Gilbert, 2013) (Moser et al., 2013)
MPL y AS04	ASIA	(Cluff, 2009)
Tiomersal (mercurio)	ADD/ADHD y autismo	(Young et al., 2008) (Geier et al., 2013)
Chitosan (CS)	Inflamación crónica que podría llevar a neurodegeneración, ASIA	(Cunningham et al., 2007), (DeLegge et al., 2008)

Discusión

Debido a la importancia de las vacunas como método preventivo de enfermedades infecciosas, es imprescindible realizar un control exhaustivo de sus componentes y los posibles efectos secundarios que estos pueden causar. Como se ha expuesto anteriormente en este trabajo, el uso de adyuvantes como potenciadores del efecto inmunogénico de la vacuna hace que a la vez esa respuesta en el cuerpo pueda ser un tanto desmedida y que provoque trastornos como ASIA o enfermedades autoinmunes.

Parece ser que, aunque tengan mecanismos de acción diferentes, todos los adyuvantes han sido relacionados con casos de ASIA, por lo que no sería un efecto secundario restringido a un solo tipo de adyuvante sino más bien un efecto secundario poco frecuente que se da como consecuencia de una sobreestimulación del sistema inmune. Esto se debe a que los adyuvantes activan una serie de mecanismos que implican lesión tisular, muerte celular, estrés oxidativo, la producción de radicales libres y cambios reparativos que provocan que las proteínas que antes eran reconocidas como propias no sean reconocidas como tales, induciendo mecanismos de autoinmunidad.

Es por estas evidencias que es necesario que el balance entre los beneficios de la vacuna y el riesgo de desarrollar efectos secundarios muy raros pero severos debe ser favorable. La ratio beneficio/riesgo debe ser muy alta y por ello la OMS afirma que "es más probable padecer un trastorno grave por una enfermedad prevenible mediante

vacunación que por una vacuna" (OMS, 2016). Aunque un solo caso de trastorno grave o defunción por vacunas ya es un precio caro que pagar, los beneficios de la vacunación compensan con creces el riesgo, debido a que sin las vacunas el número de trastornos graves y defunciones sería mucho mayor. Existen casos conocidos como el del Rotavirus donde se dejó de administrar la vacuna debido a que en casos excepcionales provocaba bloqueos intestinales severos que podían acabar con la muerte. Esto provocó que se retirara la vacuna del mercado, lo que supuso un aumento en los casos de mortalidad por el virus, muchas más muertes de las que causaba el efecto secundario intestinal, pero se hizo por el miedo que suscitaba la vacuna en la población. Este caso muestra otro grave problema, la desinformación por parte de la población sobre qué beneficios y qué riesgos tienen las vacunas.

Recientemente una pareja fue acusada por la muerte de su hijo en 2012 tras no socorrerle adecuadamente cuando éstos supieron que padecía meningitis. En lugar de eso, decidieron tratarlo con remedios caseros a base de hojas de olivo, ajo, jengibre y vinagre proporcionados por un naturópata. El niño dejó de respirar y murió tras 5 días ingresado en un hospital. Al igual que con el niño fallecido en 2015 en Olot, ambos casos han generado una gran controversia y muchos grupos pro y antivacunas han aprovechado la situación para hacerse eco. La decisión de vacunar o no a los hijos debería de ser una decisión que se toma de forma responsable, tras haber consultado fuentes fiables para informarse adecuadamente. Hay gente que considera que se debería obligar a todos los niños a ser vacunados, pero quizá lo más efectivo sería realizar campañas de concienciación ciudadana, explicar por qué son tan importantes y efectivas y los pequeños riesgos que implican. El problema es que se genera un debate más agresivo, básicamente "El bien común Vs los derechos individuales". El tema se saca de contexto y se ha comprobado mediante entrevistas y estadística que hay gente que decide no vacunar a sus hijos por el simple hecho de que no le gusta que le obliguen a hacer cosas, quieren tomar la decisión por sí mismos y esta es su forma de rebelarse al sistema. Esto provoca una reacción de preocupación por parte de los demás, ya que ese niño está expuesto a enfermedades potencialmente mortales y en algunos casos podría transmitirlo a sus hijos, aunque estos estuvieran vacunados. Aun así, cabe destacar que la causa más común por la que se decide no vacunar es por desinformación (Martínez-Diza et al., 2014), donde algunos padres creen que es innecesario debido a que son enfermedades de baja prevalencia.

Beneficios conocidos del uso de vacunas

Que las vacunas salvan vidas y que gracias a ellas se ha conseguido disminuir la mortalidad de muchas enfermedades infecciosas es bien conocido. Basta mirar la incidencia de enfermedades antes y después de la implantación de la vacunación sistemática para ver que han sido una de las razones por las que la esperanza de vida ha aumentado y la tasa de mortalidad infantil ha disminuido. De hecho, la OMS estima que la vacunación salva, anualmente, 2.5 millones de vidas en todo el mundo, sin embargo, al mismo tiempo, más de 2 millones de personas mueren por no poder acceder a las vacunas existentes. Esto se traduce en que en 2014 solo dos países

padecían la poliomielitis de forma endémica (en 1988 eran 125 países), o que el 85% de la población mundial infantil recibiera en 2014 la vacuna del sarampión. En el caso de la polio, por ejemplo, se estima que había 350.000 casos mundiales anuales en 1988 y en 2015 se registraron únicamente 74 (OMS, 2016), pero si miramos la situación de la poliomielitis en España, Figura 6, podemos ver como afectó la cobertura de la vacunación al número de casos anuales.

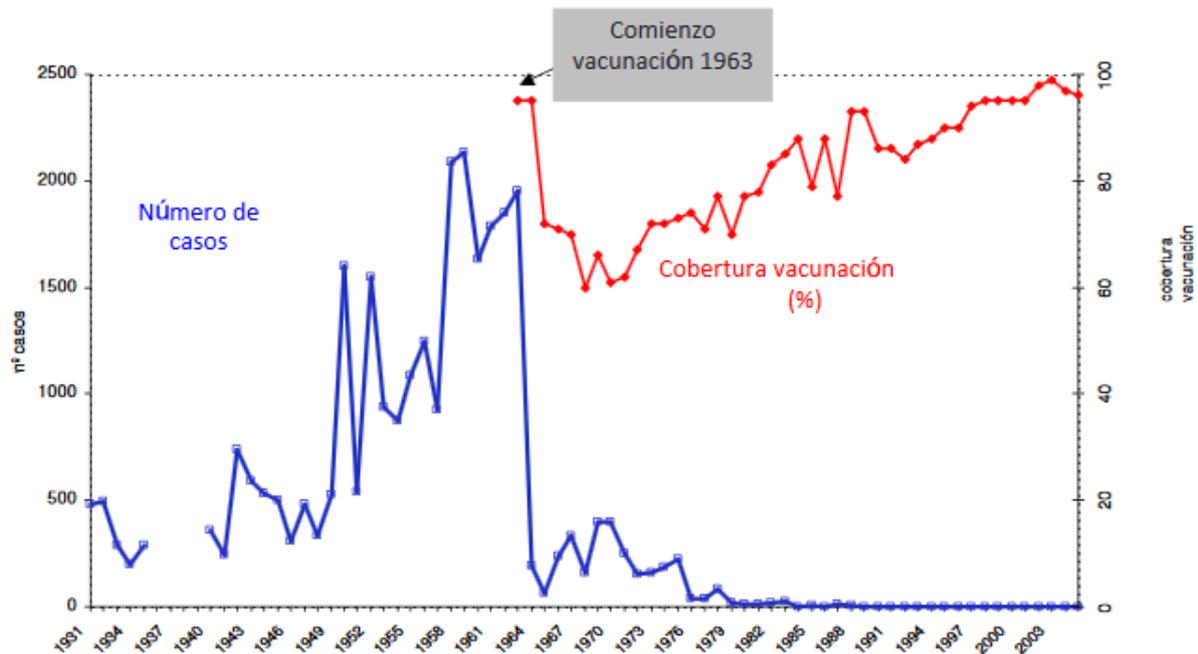


Figura 6. Poliomielitis en España entre 1931-2005. Incidencia y cobertura de vacunación. Descenso drástico del número de casos de poliomielitis en España tras la implantación sistemática de la vacunación en 1963. Se puede observar como la vacunación ejerció un efecto directo sobre el número de casos de polio en España, haciendo que entre 1964 y 1967 el número de casos disminuyera de casi 2000 a menos de quinientos (López-Perea et al., 2014).

Este papel beneficioso se observa cuando se comparan poblaciones de un país desarrollado con otro en vías de desarrollo. El no tener acceso a estas vacunas es una de las razones por las que la incidencia de estas enfermedades es tan alta y por lo que la esperanza de vida es menor en países en vías de desarrollo. Si bien es cierto que las costumbres higiénicas ayudan a prevenir enfermedades, muchas infecciones pueden propagarse independientemente de la higiene que se tenga. Si las personas no estuvieran vacunadas, enfermedades ahora poco comunes como el sarampión o la rubeola reaparecerían rápidamente. Este aspecto es fundamental ya que numerosos colectivos se basan en que debido a la baja incidencia de estas enfermedades es innecesario vacunar, cuando la realidad es que, aunque es cierto que las enfermedades son poco comunes, los agentes infecciosos que las provocan siguen circulando y con el efecto de la globalización no es muy complicado entrar en contacto con ellos. Por tanto, ya no es únicamente la función de protegernos a nosotros mismos sino también el proteger a quienes nos rodean, evitando así la propagación de enfermedades.

Riesgos de administrar vacunas con adyuvantes

Se ha comentado que la razón principal por la que algunos individuos deciden no vacunarse (o vacunar a sus hijos) es la desinformación, donde uno de los pilares que sustentan su teoría es el efecto tóxico o nocivo de los compuestos que se inyectan, como los adyuvantes o los conservantes. Incluso asocian el desarrollo de enfermedades o reacciones graves adversas al uso de vacunas multivalentes (administración simultánea de más de una vacuna), argumentando que esto aumenta el riesgo de los efectos secundarios nocivos. Esta premisa resulta un tanto incongruente, ya que cada día el sistema inmunitario de un niño se enfrenta a cientos de sustancias extrañas que pueden desencadenar respuestas inmunitarias o no, y no por ello tiene mayor probabilidad de sufrir un efecto adverso. De hecho, la idea de usar vacunas multivalentes se origina en la posibilidad de tener que inyectar menos veces, ahorrando costes y molestias. Una de las líneas de investigación actuales es la búsqueda de vacunas multivalentes con antígenos más universales, que sean comunes a todas las cepas para así ahorrar más inyecciones todavía, suponiendo menos gasto y menos pinchazos.

En cuanto a los estudios que describen la mayor prevalencia de enfermedades como el autismo o el síndrome de déficit de atención en niños vacunados, cabe destacar que estos resultados son sesgados porque en ocasiones la muestra es muy pequeña o no se tienen en cuenta otros factores que podrían afectar al estudio. Ejemplo de esto sería el trabajo de Tomljenovic et al., (2011), donde se podría pensar que no es que haya aumentado tanto el número de casos de ADD/ADHD en años recientes, sino que antes los métodos para detectarlos eran peores y que por tanto se daban muchos casos de falsos negativos. Esto podría explicar la supuesta emergencia de tantos casos de autismo o ADD/ADHD y no que el uso generalizado de vacunas esté provocando estos trastornos. Además, la idea de que la administración de vacunas con tiomersal está relacionado con el desarrollo y el aumento en la prevalencia de los casos de ASD en países occidentales pierde fuerza debido a que hace casi 15 años que prácticamente no se administran vacunas con mercurio.

Un hecho que sí parece estar bien descrito es el efecto sobreestimulador que tienen los adyuvantes en el sistema inmunitario. En ocasiones esta reacción puede ser desmesurada y provocar enfermedades inflamatorias o autoinmunes, como se ha descrito con ASIA. No es descabellado pensar que, si el efecto que se busca es aumentar la respuesta inmunogénica en el cuerpo, los individuos que metabolizan más lentamente o que sean más susceptibles a procesos inmunitarios puedan desarrollar efectos secundarios. Quizá sería conveniente realizar estudios genéticos sobre cada individuo antes de administrar las vacunas, ya que así se podría ajustar la dosis de los compuestos que se incluyen, potencialmente evitando el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Pero esta solución no es práctica ni realista debido al número tan grande de individuos a nivel mundial y el consiguiente gasto que eso supondría. Las relaciones que se han establecido entre la vacunación y el desarrollo de enfermedades no son lo suficientemente significativas como para que sea necesario establecer estas pruebas prevacunacionales, además de que no sería una solución del todo ética porque solo podrían usarla los países más desarrollados. Es por

ello que se debe tratar de buscar una solución que no produzca más desigualdades sino centrarse en adyuvantes y vacunas que sean seguros y asequibles para todos los países.

En 1998 una investigación llevada a cabo por el Dr. Wakefield y sus colaboradores (Wakefield et al., 1998) condujo a la conclusión de que existía una relación entre el suministro de la vacuna triple vírica, sarampión, paperas y rubeola (SPR) y el desarrollo de trastornos del comportamiento como el ASD. A pesar de que la muestra era muy pequeña (n=12), el diseño experimental tenía muchos fallos y las conclusiones resultaban más bien especulativas, *The Lancet* decidió publicar el artículo. Este artículo creó gran revuelo y al poco tiempo comenzaron a surgirle críticas al realizar estudios epidemiológicos que desestimaban esta relación entre la vacuna (SPR) y el autismo. Por si fuera poco, salió a la luz que la financiación del estudio de Wakefield y sus colaboradores procedía de una compañía de abogados que defendía a padres con causas abiertas contra empresas farmacéuticas productoras de vacunas, por lo que existía un conflicto de intereses. Tras recopilar toda esta información, en febrero de 2010 *The Lancet* decidió retractar el artículo, admitiendo que diversos elementos eran incorrectos y contrarios a los resultados obtenidos en investigaciones anteriores. Es por esto que resulta tan importante que las investigaciones científicas sean del todo objetivas y que no sean sesgadas, porque la consternación que provocó este científico todavía perdura.

Evidencias sólidas de la neurotoxicidad de los adyuvantes

La realidad es que existen correlaciones comprobadas entre el desarrollo de enfermedades como el GWS o la MMF y las vacunas. Durante la Guerra del Golfo, el 41% de los soldados americanos y el 75% de los soldados británicos fueron vacunados contra el Anthrax. Esta vacuna tenía un efecto que causaba la muerte neuronal en ratones, pero no se describía en humanos, aunque sí que provocaba reacciones cutáneas moderadas. Existen diversos estudios que relacionan el haber recibido esta vacuna con padecer GWS, que casusa fatiga crónica, dolor muscular, problemas cognitivos y diarreas. Aproximadamente 1/3 de los soldados que estuvieron en la Guerra del Golfo sufren esta enfermedad y aunque existen otras hipótesis sobre su origen, no debería descartarse que fuera la vacuna su causa debido a que no se conocen sus efectos a largo plazo. Existen diversos estudios que fundamentan esta relación explicando como el hidróxido de aluminio (presente en esta vacuna como adyuvante) induce a la apoptosis de las motoneuronas, aumenta los astrocitos reactivos y se permite observar proteínas tau fosforiladas, al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Shaw et al., 2009).

En cambio, la MMF es un síndrome causado por la deposición de aluminio en los macrófagos de los músculos, hecho que ocurre al inyectar vacunas con adyuvantes con base de aluminio. Estos provocan fatiga crónica, debilidad muscular y en algunos casos más severos, trastornos desmielinizantes. Todas las acciones que llevemos a cabo sobre nuestro cuerpo tienen unas reacciones, pero en este caso parece ser que esta reacción únicamente se observa en los pacientes más susceptibles, portadores de un alelo génico de un receptor que hace que estas personas se vean más

afectadas por el aluminio, favoreciendo su deposición en los macrófagos (Guis et al., 2002).

Conclusión

A pesar del increíble éxito de la vacunación como intervención en salud pública, las enfermedades infecciosas (en concreto, la neumonía) siguen siendo la causa más común de muerte en niños menores de 5 años (OMS, 2016). Parte de este éxito se debe al uso generalizado de adyuvantes que han mejorado la efectividad de las vacunas y ha hecho posible crear vacunas para antígenos que tienen poco efecto inmunoestimulador.

Con las evidencias bibliográficas existentes se puede concluir que las vacunas con adyuvantes son seguras, ya que los efectos neurotóxicos que se observan se dan en casos muy concretos donde parece ser que suele haber una predisposición genética. Para evitar poner en riesgo a estas personas más susceptibles a que padezcan una reacción desmesurada del sistema inmunitario se deben continuar investigando nuevas dianas de vacunación y nuevos adyuvantes. Por tanto, no existe relación entre los adyuvantes de las vacunas y un mayor riesgo a padecer una enfermedad neurodegenerativa o que afecte al neurodesarrollo, simplemente hay personas más susceptibles a estos compuestos y que desarrollan una enfermedad englobada en ASIA.

Bibliografía

- AEP, Comité Asesor de Vacunas de la AEP (2016). "calendario de vacunaciones de la aep 2016." from <http://vacunas.aep.org/profesionales/calendario-de-vacunaciones-de-la-aep-2016>.
- Alving, C. (1991). "Liposomes as carriers of antigens and adjuvants." *Journal of Immunological Methods* **140**(1): 13.
- Bansala V, Kumara M, Bhardwaj A, Brahmneeb HG, Singha H (2015). "In vivo efficacy and toxicity evaluation of polycaprolactonenanoparticles and aluminum based admixture formulations vaccine delivery system." *Vaccine* **33**(42): 10.
- Barregard L, Rekić D, Horvat M, Elmberg L, Lundh T, Zachrisson O (2011). "oxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. ." *Toxicological Sciences* **kfr009**.
- Bingham E, Stemmer K, & Falk HL (1967). "The effects of repeated injections of certain adjuvants on chemical carcinogenesis." *Subject Strain Bibliography*, paper 1287.
- Bishop NJ, Morley R, Chir B, Day JP, Lucas A (1997). "Aluminum Neurotoxicity in Preterm Infants Receiving Intravenous-Feeding Solutions." *New England Journal of Medicine* **336**(22): 6.
- Burbacher TM, Shen D, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T (2005). "Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal." *Environmental health perspectives*: 7.
- CDC (2011). A CDC framework for preventing infectious diseases. Sustaining the Essentials and Innovating for the future: 33.
- CDC. (2015). "Vaccines adverse events reporting system ", from <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/protect/vaccine/guillainbarre.htm>.
- Cluff, C. (2009). "Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results." *Lipid A in Cancer Therapy*, Springer New York: 13.
- Correia-Pinto JF, Csaba N, Schiller JT and Alonso MJ (2015). "Chitosan-Poly (I:C)-PADRE Based Nanoparticles as Delivery Vehicles for Synthetic Peptide Vaccines." *Vaccines* **3**: 21.

- Couette M, Boisse MF, Maison P, Brugieres P, Cesaro P, Chevalier X, Authier FJ, Gherardi RK, Bachoud-Levi AC (2009). "Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction." *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**: 8.
- Cunningham C, Champion S, Teeling J, Felton L, and Perry VH (2007). "The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I: C)." *Brain, behavior, and immunity* **21**(4): 12.
- De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, & Moser M (2000). "The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells" *International immunology* **12**(6): 9.
- DeLegge MH, Smoke A. (2008). "Neurodegeneration and inflammation " *Nutrition in clinical practice* **23**(1): 7.
- Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N (2015). "Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond." *Molecular Diversity Preservation International* **3**: 24.
- Dórea, J. G. (2011). "Integrating Experimental (In Vitro and In Vivo) Neurotoxicity Studies of Low-dose Thimerosal Relevant to Vaccines." *Neurochemical Research* **36**(6): 12.
- Elodie Passeri E, Gherardi RK, Villa C, Bachoud-Levi AC, Couette M, Itti E, Authier FJ, Brugieres P, Cesaro P (2011). "Long-term follow-up of cognitive dysfunction in patients with aluminum hydroxide-induced macrophagic myofasciitis (MMF)." *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**(11): 7.
- FDA (2015). "Thimerosal in Vaccines." *Vaccines, Blood & Biologics*.
- Fernandez-Lorenzo JR, Cocho JA, Rey-Goldar ML, Couce M, & Fraga JM (1999). "Aluminum contents of human milk, cow's milk, and infant formulas." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **28**(3): 5.
- Gallier-Beckley A, Pappan L, Madera R, Burakova Y, Waters A, Nickles M, McVey S (2015). "Characterization of a novel oil-in-water emulsion adjuvant for swine influenza virus and Mycoplasma hyopneumoniae vaccines." *Vaccine* **33**(25): 6.
- Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, Severa M, De Haan A, Pool J, Wilschut J, Fitzgerald KA, Huckriede A (2008). "Superior Immunogenicity of Inactivated Whole Virus H5N1 Influenza Vaccine is Primarily Controlled by Tolllike Receptor Signalling." *PLOS Pathogens* **4**: 8.
- Geier DA, Hooker B, Kern JK, King PG, Sykes LK and Geier MR (2013). "A two-phase study evaluating the relationship between Thimerosal-containing vaccine administration and the risk for an autism spectrum disorder diagnosis in the United States." *Translational Neurodegeneration* **2**(25): 12.
- Geier MR, Geier DA (2003). "Neurodevelopmental Disorders after Thimerosal-Containing Vaccines: A Brief Communication." *Experimental biology and medicine* **228**(6): 5.
- Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ (2001). "Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle." *Brain* **124**(9): 11.
- Gilbert, SC (2013). "Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines." *Vaccine* **31**(39): 7.
- Glenny AT, Barr M (1931). "The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum." *The Journal of Pathology and Bacteriology* **34**(2): 8.
- Gross CP, Sepkowitz K (1998). "The Myth of the Medical Breakthrough: Smallpox, Vaccination, and Jenner Reconsidered " *International Journal of Infectious Diseases* **3**(1): 7.
- Guis S, Pellissier J, Nicoli F, Reviron D, Mattei JP, Gherardi RK, Pelletier J, Kaplanski G, Figarella-Branger D, Roudier J (2002). "HLA-DRB1*01 and macrophagic myofasciitis." *Arthritis & Rheumatism* **46**(9): 3.
- Gupta RK, Rost B, Relyveld E, Siber GR (1995). "Adjuvant Properties of Aluminum and Calcium Compounds." *Pharmaceutical Biotechnology* **6**: 20.
- Hansen SG, Ford J, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, Whizin N, Oswald K, Shoemaker R, Swanson, T, Legasse AW, Axthelm MK, Nelson JA, Jarvis MA, Parks CL, Chiuchiolo MJ, Piatak, Jr. M, Lifson JD, Picker, LJ (2011). "Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector-memory T cell vaccine." *Nature* **473**: 5.
- Hessel, L. (2002). "[Mercury in vaccines]." *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* **187**(8): 10.
- Invivogen. (2011). "Vaccine Adjuvants - Review." from www.invivogen.com.
- Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld, Y (2009). "Adjuvants and autoimmunity." *Lupus* **18**(13): 9.
- Kantoff PW, Higano C, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson, DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB and Xu Y (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." *New England Journal of Medicine* **363**(5): 12.
- Keith LS, Jones D, Chou CH (2002). "Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations." *Vaccine* **20**: 5.

- Kensil CR, Kammer R (1998). "QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant." *Expert Opinion on Investigational Drugs* **7**(9): 8.
- Khan, KH (2013). "DNA vaccines: roles against diseases." *Germs* **3**(1): 10.
- Khan Z, Combadière C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, Gherardi RK, Cadusseau J (2013). "Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain." *BMC Medicine* **11**(1).
- Knuf M, Leroux-Roels G, Rümke H, Rivera L, Pedotti P, Arora AK, Cioppa, GD (2015). "Immunogenicity and safety of cell-derived MF59®-adjuvanted A/H1N1 influenza vaccine for children." *Human vaccines & immunotherapeutics* **11**(2): 19.
- Kool M, Soullié T, Van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, & Lambrecht BN. (2008). "Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells." *The Journal of experimental medicine* **205**(4): 14.
- Lanzavecchia (1993). "Identifying strategies for immune intervention." *Science* **260**(5110): 8.
- Leroux-Roels, G. (2010). "Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response." *Vaccine* **28**: 12.
- López Hernández B, Lagunas Sorinas J, Marín Rodríguez I, Gallardo García V, Pérez Morilla E, Mayoral Cortés J M (2010). "Rapid communications Spotlight on measles 2010: An ongoing outbreak of measles in an unvaccinated population in Granada, Spain, October to November 2010." *Eurosurveillance* **15**(50): 4.
- López-Perea N, Masa Calles J, Grupo de Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda en España (2014). "Plan de erradicación de la poliomielitis. Vigilancia de parálisis flácida aguda " *Boletín Epidemiológico Semanal* **22**(7).
- Martínez-Diza S, Martínez Romero M, Fernández-Prada M, Cruz Piqueras M, Molina Ruano R, Fernández Sierra M.A (2014). "Demandas y expectativas de padres y madres que rechazan la vacunación y perspectiva de los profesionales sanitarios sobre la negativa a vacunar." *Anales de Pediatría* **80**(6): 9.
- Møller-Madsen, B. (1991). "Localization of mercury in CNS of the rat. V. Inhalation exposure to metallic mercury." *Archives of toxicology* **66**(2): 11.
- Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Morse MA, Lyerly HK (2007). "Dendritic cell vaccines" [*Frontiers in Bioscience* **12**(11): 11.
- Moser C, Müller M, Kaeser MD, Weydemann U, Amacker M (2013). "Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system." *Expert review of vaccines* **12**(7): 13.
- OMS. (2015). "Rabia." *Centro de prensa*.
- OMS (2016). "¿Cuáles son algunos de los mitos, y los hechos, sobre la vacunación?" *WHO*.
- OMS (2016). "Mortality and global health estimates." *Global Health Observatory data repository*.
- OMS (2016). "Poliomielitis." *Centro de prensa*.
- OMS (2016). "Reducción de la mortalidad en la niñez." *Centro de prensa* **178**.
- Pellegrino P, Clementi E, Radice S (2015). "On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives." *Autoimmunity Reviews* **14**(10): 9.
- Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, and Shaw CA (2006). "Aluminum Adjuvant Linked to Gulf War Illness Induces Motor Neuron Death in Mice." *NeuroMolecular Medicine* **9**(1): 18.
- Reddy LH, Couvreur P (2009). "Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy." *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 15.
- Rose, N. (2010). "Autoimmunity, infection and adjuvants." *Lupus* **19**(4): 5.
- Shaw CA, Li D, Tomljenovic L (2014). "Are there negative CNS impacts of aluminum adjuvants used in vaccines and immunotherapy?" *Immunotherapy* **6**(10): 17.
- Shaw CA, Petrik M (2009). "Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration." *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**: 8.
- Shoenfeld Y, Agmon-Levine N (2011). "'ASIA' - Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants." *Journal of Autoimmunity* **36**: 5.
- Sun HX, Xie Y, Yec YP (2009). "Advances in saponin-based adjuvants." *Vaccine* **27**: 10.
- Tomljenovic L, Shaw CA (2011). "Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism?" *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**(11): 11.
- Wakefield AJ, Murch S, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Valentine, A. (1998). "RETRACTED: Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children." *The Lancet* **351**(9103): 5.
- Yokel RA, McNamara P (2008). "Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview." *Pharmacology & Toxicology* **88**(4): 10.
- Young HA, Geier D, Geier MR (2008). "Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: An assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink." *Journal of the Neurological Sciences* **271**(1-2): 9.