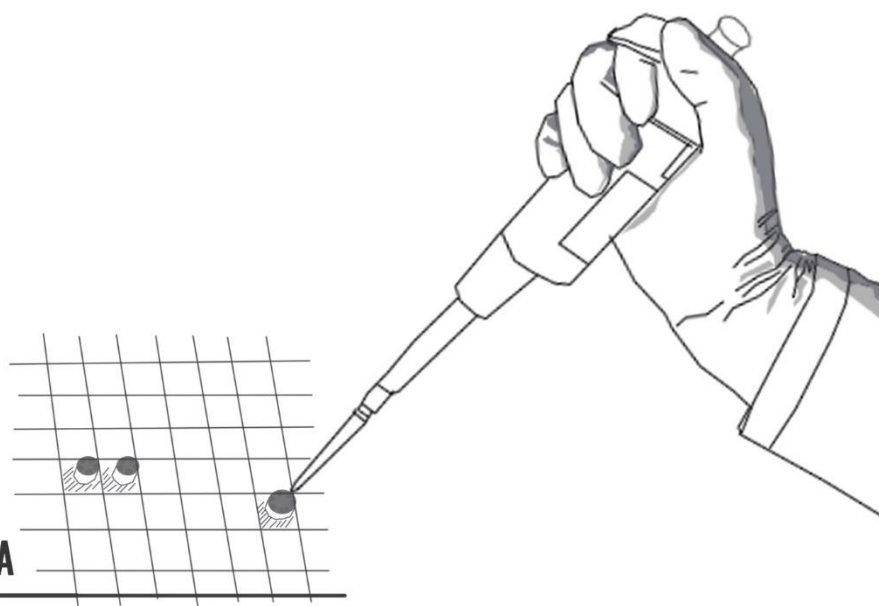


FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
TRABAJO FIN DE GRADO
ANDREA OCAÑA GARCÍA



VACUNAS BASADAS EN NANOTECNOLOGÍA



GRADO EN FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

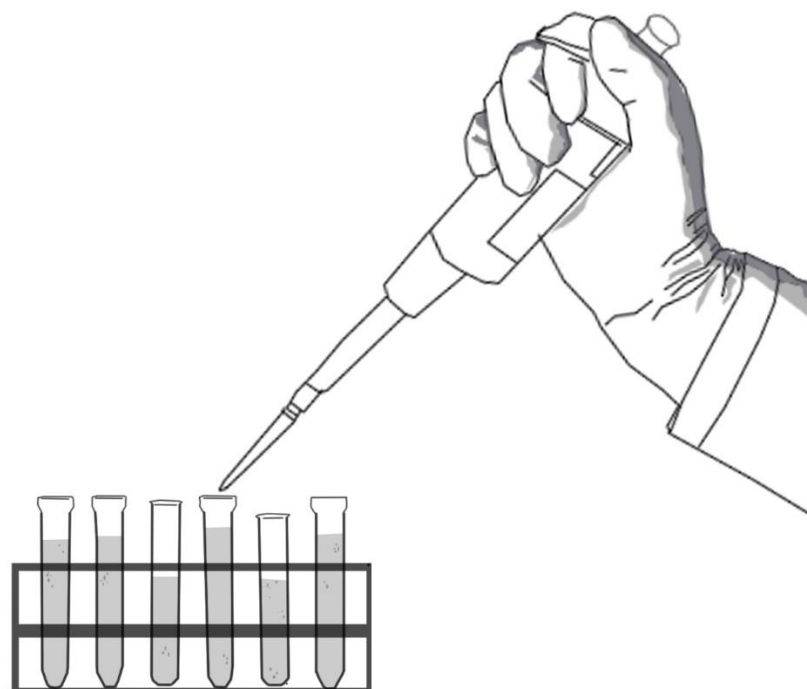
TRABAJO FIN DE GRADO

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CURSO: 2019 - 2020

ALUMNA: ANDREA OCAÑA GARCÍA

TUTORA: JOSEFA ÁLVAREZ FUENTES



VACUNAS BASADAS EN NANOTECNOLOGÍA

RESUMEN:

La nanotecnología incluye la síntesis, diseño, caracterización y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a una escala de 1-100 nanómetros. Se ha aplicado a numerosos campos, entre ellos las ciencias de salud, donde ha dado lugar a nuevas disciplinas como la nanomedicina, aplicándose por ejemplo a la elaboración de nanovacunas.

El uso de la nanotecnología aplicado en la elaboración de vacunas está teniendo cada vez mayor influencia. Gracias a la aplicación de esta tecnología se han obtenido muchas ventajas debido a la disminución del tamaño de las partículas y su respectiva administración a través de vías no invasivas, como son la vía tópica donde se incluye la administración de la piel y de las mucosas, o la liberación transdérmica.

Las nanovacunas desarrolladas como nanosistemas usan a éstos como agente transportador del propio antígeno, al igual que también sirven para dirigirlo a una diana específica, para potenciar la respuesta inmunológica frente al antígeno e incluso para una liberación lenta del mismo; permitiendo así una mejora en la estabilidad del antígeno y la inmunogenicidad.

En este sentido, se han desarrollado muchos tipos de nanosistemas usando diferentes componentes. Los tipos de nanosistemas que se han investigado se clasifican en suaves y duros, los cuales, se diferencian según su naturaleza orgánica o inorgánica respectivamente. Dentro de ellos, se han investigado liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas, partículas similares a virus, nanotubos de carbono y nanopartículas de oro. Por otro lado, también destacan otros nanosistemas, independientemente de esta clasificación, como son las nanoemulsiones.

Palabras claves: *Antígeno, inmunogenicidad, nanopartículas, nanosistemas, nanotecnología, vacuna.*

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	<u>Antígenos</u>	<u>5</u>
1.2.	<u>Vacunas.....</u>	<u>5</u>
1.3.	<u>Características y principales protagonistas de la respuesta inmune</u>	<u>7</u>
1.4.	<u>Adyuvantes</u>	<u>8</u>
1.5.	<u>Nanotecnología</u>	<u>11</u>
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	METODOLOGÍA.....	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1.	<u>Ventajas del uso de nanosistemas en vacunación</u>	<u>14</u>
4.2.	<u>Relación entre propiedades de las nanovacunas y su formulación</u>	<u>16</u>
4.2.1.	Tamaño de las nanopartículas	16
4.2.2.	Carga superficial	17
4.2.3.	Morfología de las partículas.....	18
4.2.4.	Hidrofobicidad	19
4.3.	<u>Principales nanosistemas utilizados en la fabricación de vacunas</u>	<u>19</u>
4.3.1.	Nanosistemas orgánicos.....	19
4.3.2.	Nanosistemas inorgánicos.....	27
4.3.3.	Otros nanosistemas	30
4.4.	<u>Nanovacunas en fase de investigación y aprobadas</u>	<u>31</u>
4.5.	<u>Resumen nanosistemas.....</u>	<u>32</u>
5.	CONCLUSIONES.....	34
6.	BIBLIOGRAFÍA	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antígenos

Un antígeno es una sustancia que provoca que el sistema inmunitario produzca anticuerpos contra sí mismo. Es decir, nuestro sistema inmunitario no reconoce la sustancia y actúa desembocando una serie de procesos para combatirla.

1.2. Vacunas

Se entiende por vacuna cualquier preparación que va a ser administrada con el fin de producir inmunidad hacia una enfermedad a partir de la estimulación del sistema inmune y la producción de anticuerpos.

La clasificación principal de las vacunas se basa en (Department of Health and Human Services (HHS) 2017):

- Vacunas vivas atenuadas.
- Vacunas inactivadas o muertas.
- Vacunas con toxoides.
- Vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas.

Las vacunas vivas atenuadas se componen de microorganismos debilitados causantes de la enfermedad; como tales ocasionan una infección inaparente o con síntomas mínimos respecto a la infección natural, en base a la cual se desarrolla la inmunidad. Un ejemplo sería la vacuna de la triple vírica que actúa frente al sarampión, la rubéola y las paperas (Coronado, 2017).

Sin embargo, las vacunas inactivadas o muertas presentan el o los microorganismos completos pero inactivados por algún método físico o químico. Un ejemplo sería la vacuna de la gripe.

Las vacunas con toxoides, como bien su nombre indica, usan para producir esa respuesta inmune la toxina producida por el propio microorganismo. Por tanto, la inmunidad queda orientada de forma específica para la toxina. Destaca dentro de este grupo la vacuna del tétanos.

Por último, encontramos vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas, las cuales usan partes específicas del microorganismo, como su proteína, azúcar o cápsula, para estimular la producción de anticuerpos. El único inconveniente que presentan es que tiene una mayor probabilidad de necesitar vacunas de refuerzo para que sea efectiva la protección. Destaca en este tipo de preparaciones la vacuna de la hepatitis B.

Las vacunas más novedosas que podemos destacar son las de ADN o las de vectores recombinantes, que se contemplan como el futuro de las vacunas.

Las vacunas de ADN están compuestas por diversos antígenos (bacterias, virus, parásitos o antígenos de origen tumoral) codificados en plásmidos que pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora. En comparación con los demás tipos, presentan una serie de ventajas destacables como el desarrollo de una buena memoria inmunológica, que podría depender de la propia presencia del ADN (González-Romo y Picazo, 2015).

También destaca su fácil producción, ya que el ADN es estable y fácil de fabricar, pero todavía es experimental debido a que ninguna vacuna de ADN ha demostrado producir una respuesta inmunológica, requerida para prevenir la infección (Cambroner y Prado-Cohrs, 2017).

Las vacunas tipo vectores recombinantes son justamente eso, vectores (un virus o una bacteria) que expresan antígenos exógenos. Para ello, se insertan en el ADN del vector uno o más genes que codifican antígenos, generalmente proteínas. Así, cuando el vector replica en el huésped, no solo expresa sus proteínas propias sino también las de los genes insertados.

En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se recoge un resumen de los tipos de vacunas nombradas anteriormente:

Vacuna	Constitución	Ejemplos
Vacunas vivas atenuadas	Patógeno entero	Triple vírica
Vacunas inactivadas	Patógeno entero	Gripe
Vacunas recombinantes, polisacáridos, combinadas y de subunidades	Parte del patógeno	Hepatitis B
Vacunas toxoides	Toxina	Tétanos
Vacunas de ADN	ADN	Estudios de investigación

Tabla 1. *Tipos de vacunas con sus respectivas constituciones y ejemplos* (Díaz-Arévalo y Zeng, 2020).

1.3. Características y principales protagonistas de la respuesta inmune

Nuestro sistema inmunitario está estructurado y organizado en dos grandes componentes: sistema innato y sistema adaptativo. Respecto a la utilización de vacunas, la activación del sistema inmune innato precede a la generación de inmunidad adaptativa.

El sistema innato constituye la primera línea de defensas formada por la combinación de barreras físicas (piel y mucosas), células especializadas que circulan por la sangre y el sistema linfático (células fagocíticas, células dendríticas, células asesinas o Natural Killer (NK, por sus siglas en inglés), y moléculas efectoras no celulares (complemento y lisozima)) contra los patógenos (Rosales-mendoza y González-ortega, 2019).

Por otro lado, el sistema adaptativo está compuesto por linfocitos, tanto los circulantes como los que se acumulan en los órganos linfoides secundarios. Existen dos tipos de linfocitos implicados en la respuesta adaptativa, las células B (producidas en la médula ósea e hígado fetal) y las células T (precursores de la médula ósea que migran al timo donde maduran), las cuales se subdividen, según su función se clasifican en células colaboradoras (linfocitos T CD4+) o en células efectoras (linfocitos B y linfocitos T CD 8+).

Los linfocitos B se encargan de la producción de anticuerpos ya que son responsables de la inmunidad humoral y actúan frente a patógenos extracelulares. Estos pueden reconocer a los antígenos sin la necesidad de que sean presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) a diferencia de los linfocitos T que si tienen esta necesidad. Los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular frente a patógenos intracelulares, además, regulan la respuesta de las células B.

Las células T se caracterizan por la expresión de un marcador de superficie, clasificándose en CD4+ y CD8+. Las CD4+ reconocen antígenos en el complejo de histocompatibilidad de clase II (CMH clase II), las cuales, son principalmente células colaboradoras que se conocen como linfocitos T colaboradores (Th). Se pueden dividir en varios subgrupos según el perfil de citoquinas que secretan (Cambroner, 2017):

- Células Th1 segregan interferón gamma (INF- γ).
- Células Th2 son productoras de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13).
- Otros tipos adicionales de subgrupos de Th, como Th17 (segregan IL-17, IL-9, IL-22 e IL-23), Th folicular (segregan IL-21) y linfocitos T reguladores.

Respecto la eficacia de las vacunas, ésta va a depender de su capacidad para inducir células T y B de memoria, a través de las vías inmunes Th1 y Th2, respectivamente.

Pero no solo existe el enfoque profiláctico para la utilización de vacunas, no podemos olvidar el posible uso terapéutico de las vacunas. Las vacunas profilácticas se usan en la prevención de enfermedades infecciosas virales, bacterianas o parasitarias. Mientras que las vacunas terapéuticas, desarrolladas hasta ahora, se administran para activar la respuesta inmune contra las células tumorales residuales existentes, principalmente en combinación con cirugía o quimioterapia, con la intención de prevenir o prolongar la vida del paciente.

Hoy día, un ejemplo de vacuna terapéutica para el cáncer de próstata es Provenge® (Dendreon), la cual ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) (Giese, 2014).

1.4. Adyuvantes

Hoy día se conoce como adyuvante a cualquier sustancia, molécula o preparado químico que, incorporado al antígeno o administrado simultáneamente con él, es capaz de incrementar la potencia, calidad y duración de la respuesta inmune específica causando, al mismo tiempo, una mínima toxicidad (Pedroza-Roldan et al., 2018).

Los adyuvantes en vacunas estimulan las células presentadoras de antígenos y se dirigen al sistema inmune innato, produciendo una fuerte respuesta inmune. Se pueden clasificar en tres grupos, como (Negahdaripour et al., 2017);

- 1- Sistemas de administración de compuestos no inmunoestimulantes, que se dirigen y presentan la vacuna al sistema inmune,
- 2- inmunoestimuladores, es decir, estimulan directamente al sistema inmune innato, y
- 3- combinación de las dos clases anteriores mencionadas, presentando mayor eficacia.

Por tanto, cada vacuna lleva incorporado su coadyuvante idóneo. Sin embargo, no existe un gran número de adyuvantes que se empleen debido a que frecuentemente ejercen elevada toxicidad.

Los adyuvantes deben cumplir una función específica cuando se incorporan con el antígeno, ejerciendo un mecanismo de acción u otro. Basándonos en la clasificación funcional de Schijns, encontramos (Batista-Duharte et al., 2014) **(Figura 1)**:

1. Estimuladores de la señal 1, son los presentadores de antígenos. Se basan en que la estimulación linfocítica depende de la presentación antigénica en ganglios linfáticos regionales, por medio de las células presentadores de antígenos (CPA), fundamentalmente células dendríticas. Son los adyuvantes con efecto depósito y que garantizan una lenta y prolongada liberación del antígeno.

2. Estimuladores de la señal 2, son los coestimuladores. Esta señal de activación requiere la liberación de citoquinas o de moléculas coestimuladores en las CPA para potenciar la estimulación de la respuesta inmune específica. Para ello, necesita la activación previa de las CPA, la cual, se puede llevar a cabo por dos vías no excluyentes que son:
 - a) Señal 0, estos adyuvantes son partes integrantes de las bacterias reconocidas por las CPA, que cuando son detectadas provocan la estimulación del funcionamiento del sistema inmune.
 - b) A través de las señales de peligro, las cuales son moléculas endógenas, que se liberan cuando hay necrosis celular. Es decir, cuando provocan daño en las células liberan parte de estas que al ser detectadas por el sistema inmune producen su activación.
3. Estimuladores de la señal 3, son los polarizadores a Th1/Th2. Las células de inmunidad innata activadas son capaces de activar a los linfocitos T auxiliares inactivados (Th 0) polarizando la respuesta inmune hacia un patrón Th1 o Th2, determinado por el perfil de citoquinas que liberen otros factores. Esta polarización depende de varios factores como son el tipo de antígeno, la vía de inoculación y el adyuvante empleado.

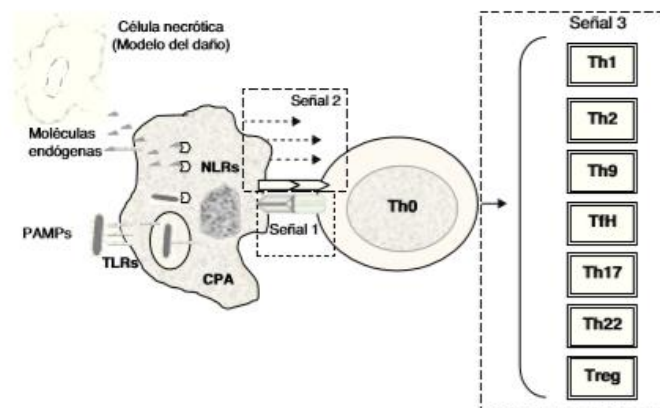


Figura 1. Esquema de los mecanismos de acción que pueden llevar a cabo los adyuvantes (Batista-Duarte et al., 2014).

En resumen, estos mecanismos de acción del adyuvante son, la formación de depósitos de antígenos, la inducción de inflamación local y el aumento de la captación de antígeno por las CPA (Soema et al., 2015).

La elección del mecanismo de acción del adyuvante depende del tamaño y de la carga del nanosistema usado. Esto se demuestra en la siguiente imagen (**Figura 2**), la cual, es un estudio donde se compara la entrada celular de virus y la entrada del nanosistema. En la parte E se muestra que los nanosistemas similares en tamaño al virus pueden ser internalizadas por células. Por otro lado, en la parte F se muestra que las nanopartículas cargadas positivamente son más atraídas que las nanopartículas cargadas negativamente a la introducción en la membrana celular (Sulczewski et al., 2018).

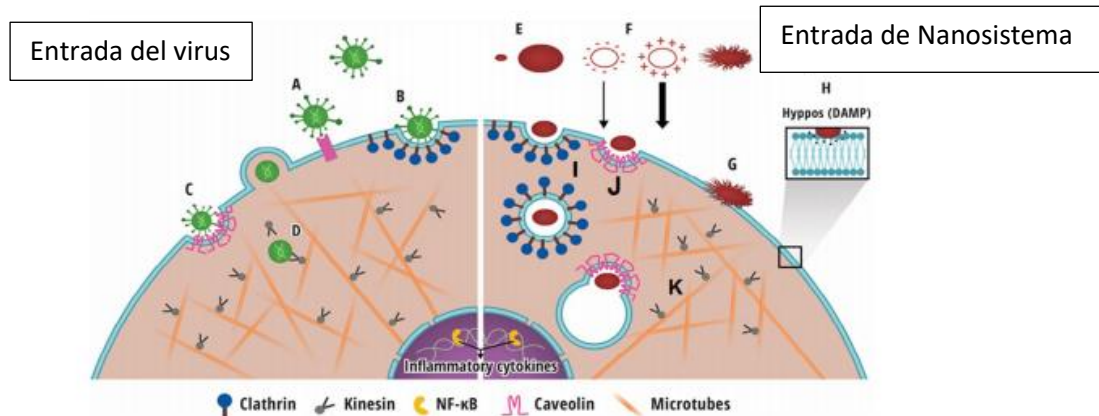


Figura 2. Comparación de la entrada del virus y la entrada del nanosistema en el organismo (Sulczewski et al., 2018).

A la hora de buscar el adyuvante “ideal”, nos centramos en una serie de características que debe cumplir (Batista-Duharte et al., 2014):

- I. Seguro, que no produzca efectos adversos inmediatos o a largo plazo.
- II. Bien definido desde el punto de vista químico.
- III. Bien definido en su mecanismo de acción.
- IV. Biodegradable tras su administración.
- V. Químicamente estable en su envase por largo tiempo (al menos 2 años) y con pocas probabilidades de variaciones entre lotes.
- VI. Capaz de desarrollar respuestas inmunes efectivas, con alto porcentaje de protección, utilizando bajas concentraciones de antígenos, con pocas dosis y por diferentes vías de administración, incluyendo las mucosas.
- VII. Elevada eficacia contra cualquier antígeno.
- VIII. De fácil preparación.
- IX. De bajo coste.

En resumen, las principales funciones de los adyuvantes basados en biomateriales son la administración de antígenos y la estimulación inmune.

Estos biomateriales pueden ser cualquier sustancia biocompatible, natural o sintética, diseñada para interactuar con los sistemas biológicos, y con propiedades fisicoquímicas favorables incluida una gran área superficial para la biofuncionalización (conjugación multivalente y modificación de la superficie para la orientación específica de células), tamaño flexible (micro a nanoescala), una alta capacidad de carga de antígeno, una adecuada estabilidad in vivo, y cierta capacidad de respuesta a estímulos o al medio ambiente (Bose et al., 2019).

1.5. Nanotecnología

La ciencia de la nanotecnología incluye la síntesis, diseño, caracterización y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a una escala de 1-100 nanómetros (Guerrero Arellano et al., 2017).

Por otro lado, gracias al tamaño nanométrico de las partículas que desarrollan esta tecnología, tienen la capacidad de atravesar muchas de las barreras fisiológicas e interactuar fácilmente con las biomoléculas tanto en la superficie como en el interior de las células (Gómez Garzón, 2019).

Cuando se utilizan para la administración de fármacos, conlleva una mejora en las estrategias de tratamiento disponible por acción en dos niveles principales (Tekade et al., 2017);

1. Confiere nuevas propiedades a un agente farmacéutico, es decir, mayor estabilidad, farmacocinética modificada y menor toxicidad,
2. Dirige el agente activo directamente al lugar de acción.

Hoy día, la nanotecnología está teniendo gran influencia tanto en el campo del desarrollo científico como el técnico, por ello, se han desarrollado diferentes tipos de nanoestructuras de aplicación en biomedicina.

El diseño de vacunas basadas en nanotecnología, también denominado nanovacunas, se centra en sistemas de administración de nanocarriers o nanosistemas para mejorar la inducción eficiente de inmunidad y el suministro de antígenos (Sulczewski et al., 2018).

Respecto a las nanovacunas, presentan una serie de ventajas e inconvenientes, que se muestran en la siguiente imagen (**Figura 3**) (Yadav et al., 2018):

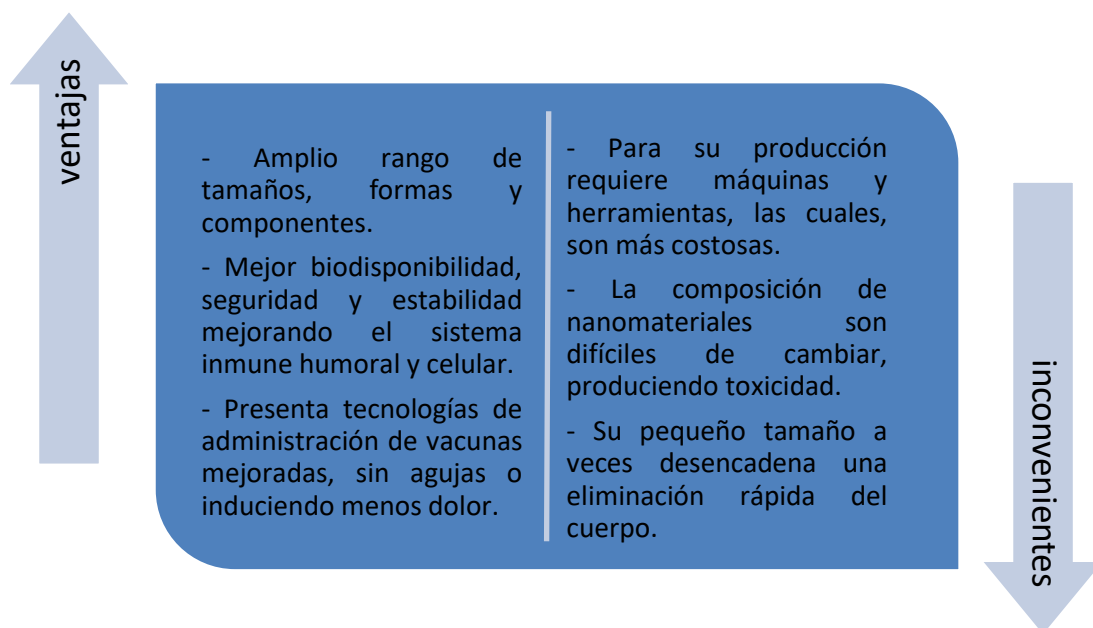


Figura 3. Ventajas e inconveniente que presentan las nanovacunas. **Fuente:** Elaboración propia.

Así mismo, los nanosistemas usados para elaborar vacunas suelen dividirse en suaves y duros. Los suaves se componen de compuestos orgánicos como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos (como el ADN, ARN o ácido ribonucleico) o carbohidratos; mientras que las duras se componen de materiales inorgánicos como metales o cerámicas, destacando las de oro u hierro (Catarina, 2019).

El objetivo de desarrollar vacunas basadas en nanosistemas, se centra en que los antígenos, como los fragmentos de proteínas, permanezcan mayor tiempo para que las células inmunitarias que recubran la superficie específica a la que va destinado el nanosistema, los agarren y entreguen a las células T.

Los nanosistemas usados como vacunas contra el cáncer ofrecen una serie de ventajas respecto a las vacunas contra el cáncer tradicional, se incluyen (Liu et al., 2019)

- a. protección de las vacunas contra la degradación,
- b. dirigirse a células dendríticas con el uso de ligandos,
- c. mejorar la presentación cruzada para inducir linfocitos T citotóxicos CD8+, siendo esta presentación cruzada un tipo no convencional de presentación de antígenos que activa a los linfocitos T CD8+.
- d. administración conjunta de vacunas y adyuvantes, u otros agentes, para mejorar la respuesta antitumoral y,

- e. mejorar la capacidad de controlar la liberación y distribución.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo bibliográfico es el estudio de la producción de vacunas usando la nanotecnología para la prevención y/o control de varias patologías.

Para alcanzar este objetivo se desarrollaron los siguientes objetivos secundarios:

- Exponer las ventajas que ofrece el uso de los nanosistemas para la vacunación.
- Evaluar las características de los nanosistemas que pueden influir en la respuesta inmune.
- Describir y estudiar los principales nanosistemas usados para desarrollar vacunas basadas en nanotecnología.

3. METODOLOGÍA

En la ejecución de este trabajo de revisión bibliográfico que se titula 'Vacunas basadas en nanotecnología', se estudió numerosos artículos científicos de distintas bases de datos, entre ellas PubMed y ScienceDirect.

En la base de datos Pubmed, se introdujeron en la búsqueda de artículos científicos las palabras claves de *nanotechnology* y *vaccines*, al ocasionar un resultado de 3098 artículos, se aplicaron criterios de exclusión, centrándose la búsqueda en aquellos artículos de investigaciones basados en vacunas de uso humano y de los últimos seis años, es decir, se seleccionaron los artículos publicados en el intervalo desde 2014 a 2020. De este modo se redujo el número de artículos a total de 1172.

Al considerarlo aún un número elevado de artículos, se filtró esta vez añadiendo otra palabra clave que fue *nanoparticles*. Finalmente, se obtuvieron 568 artículos. También se filtró como palabra clave *nanosystem* con el fin de concretar más la búsqueda, en la cual, solo se encontró 23 artículos. Todas estas palabras claves se realizaron en una misma búsqueda en conjunto, aplicándolas en el orden descrito.

Por otro lado, también se ha obtenido información a partir de ScienceDirect, así mismo usamos las mismas palabras claves que en PubMed, es decir, *nanotechnology vaccines*. Se obtuvo un

total de 463 resultados. Al ser un número elevado de artículos, se acortó usando sólo los de acceso abierto, los cuales fueron 16.

En ambas bases de datos, en la búsqueda más específica de los nanosistemas descritos posteriormente, se usó otras palabras claves como *carbon nanotubes vaccines*, *properties nanoparticles*, *inorganic nanoparticles*, *gold nanoparticles*, *liposome nanovaccines*, *virus-like particles nanovaccines*, *surface charge nanovaccines*.

Por otro lado, se emplearon diferentes portales web de búsqueda, entre ellos usó el portal web de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla (<http://fama.us.es>), donde proporcionan libros en línea.

Se aplicó los criterios de exclusión nombrados anteriormente, es decir, se usó como palabras claves *nanotechnology*, *vaccine* y *nanovaccines*, en el intervalo de 2014 a 2020. Al introducir *nanovaccines*, se obtuvieron dos resultados y se especificó en el libro 'Nanovaccines'. Sin embargo, en la búsqueda con *nanotechnology vaccine* se obtuvo un total de 19 libros, del cual, se especificó en 'Molecular Vaccines From Prophylaxis to Therapy-Volume 2'. Se usaron ambos libros ya que facilitan la información de todos los nanosistemas de interés.

También se consultó, Google Académico que proporciona acceso a artículos, libros, resúmenes, sitios webs... También se usó el criterio de exclusión del período de tiempo como en los casos anteriores, es decir, en el rango de 2014 a 2020, y como palabras claves usamos, *nanotechnology vaccines*. A la hora de especificar un nanosistema, se usaron como palabras claves *carbon nanotubes vaccines*, *properties nanoparticles*, *inorganic nanoparticles*, *gold nanoparticles*, *liposome nanovaccines*, *virus-like particles nanovaccines*, *surface charge nanovaccines*.

En resumen, para el desarrollo del presente trabajo de revisión bibliográfica se ha procurado tener en cuenta las publicaciones más recientes y actualizadas, con un total de 64 artículos científicos y dos libros nombrados anteriormente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ventajas del uso de nanosistemas en vacunación

La vacunación es una estrategia útil tanto para combatir tanto enfermedades infecciosas, como otras como el cáncer y el Alzheimer. Es decir, permiten la prevención y/o control de diferentes enfermedades (Al-Halifa et al., 2019).

Las nanovacunas generan respuestas amplificadas, específicas y robustas en comparación con las vacunas tradicionales a pesar de la similitud en sus mecanismos de activación inmune.

Por ello, el desarrollo de las nanovacunas se ha centrado en el diseño y elaboración de nanosistemas que sirvan como vehículos o transportadores de antígenos, y que liberen éstos en el momento y lugar oportuno, es decir, ante células específicas del sistema inmunológico inductoras de la respuesta inmune. Así, uno de los principales objetivos a alcanzar con los nanosistemas en vacunación es la liberación controlada y prolongada en el sitio de acción.

Una de las ventajas que presentan las nanovacunas es que se pueden ajustar de modo que pueden entregar sus cargas para la optimización de la activación inmunológica. Por ejemplo, es posible ajustar el tamaño y forma de las nanopartículas de oro y otros metales con el fin de que tengan colores y emitan luz de forma específica.

Hay que destacar que las vacunas basadas en nanosistemas permiten formular combinaciones de adyuvantes y antígenos a través de sistemas tipo liposomas o nanoemulsiones.

Las vías de administración más comunes de estas vacunas son la vía nasal y la oral, evitando así el uso de agujas y siendo más atractivo para los pacientes. Esta característica es muy significativa en países en vías de desarrollo, en los cuales habitualmente se hace un uso no seguro del material de inmunización (agujas y jeringas), debido a que lo reutilizan y lo manejan en condiciones no estériles; siendo éste el principal foco de proliferación de varias enfermedades que se contagian por los fluidos biológicos (Vicente y Sanchez, 2014).

A continuación, mostramos las ventajas e inconvenientes (**Figura 4**) que presentan el uso de nanosistemas en vacunación (Yadav et al., 2018).

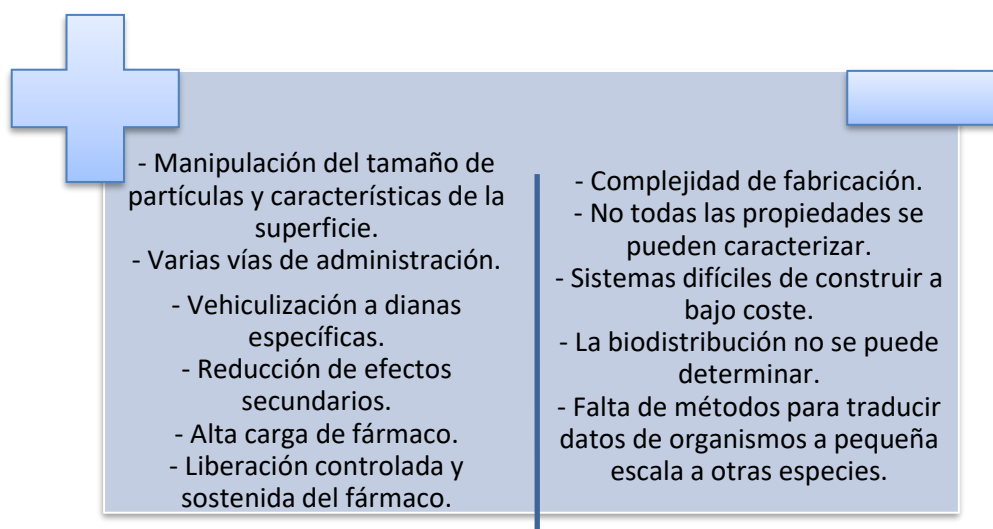


Figura 4. Ventajas y desventajas del uso de nanosistemas. Fuente: Elaboración propia.

4.2. Relación entre propiedades de las nanovacunas y su formulación

La administración de vacunas basadas en nanopartículas surgió con el objetivo de impulsar respuestas inmunitarias tanto primarias como secundarias en el cuerpo.

Las respuestas inmunes primarias son aquellas que protegen al cuerpo de los posibles daños que pueden ocurrir en la primera exposición al patógeno o antígeno, y las respuestas secundarias, se desencadenan dependiendo de la memoria inmunológica generada de la primera exposición y protegen al cuerpo de futuros encuentros con el mismo epítipo (Bhardwaj et al., 2020).

Las nanopartículas pueden circular por el cuerpo sin causar riesgo de embolia debido a su pequeño tamaño y son capaces de penetrar en las células y sus diferentes compartimentos, además de que pueden ser elaboradas a partir de materiales biodegradables (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

La potenciación de la inmunogenicidad es atribuible al tamaño de partícula a nanoescala, que facilita la absorción por las células fagocíticas, el tejido linfoide asociado al intestino y el tejido linfoide asociado a la mucosa, lo que lleva a un reconocimiento y presentación de antígeno eficiente cuando los nanosistemas llegan a estos tejidos (Kim et al., 2014)

A continuación, vamos a detallar factores que influyen en las propiedades de las nanovacunas y en su biodistribución:

4.2.1. Tamaño de las nanopartículas

El tamaño de una partícula presente en el organismo se relaciona directamente con su capacidad de transitar a los ganglios linfáticos, sus múltiples vías de absorción y su potencial influencia en los tipos de resultados inmunes (Daniel Harris et al., 2017).

Se ha demostrado que las partículas más pequeñas inducen respuestas inmunes Th2 mientras que las partículas más grandes promueven el interferón γ (IFN- γ) y respuestas típicas Th1 (Bungener et al., 2017).

Por tanto, el tamaño de partículas es una característica clave en la regulación de las funciones de las nanovacunas (Liu et al., 2019a).

Este parámetro influye en la absorción, distribución, excreción y metabolismo. Por tanto, es importante definir el tamaño de las partículas del nanosistema que vamos a emplear para desarrollar la vacuna. Para ello, se usa como herramienta de medida del tamaño de partícula el cálculo del radio hidrodinámico.

El radio hidrodinámico se calcula reordenando la ecuación de Stokes-Einstein (Khatib, 2015),

$$D = kT / 6\pi\eta R$$

donde: D, es el coeficiente de difusión,
 K, es la constante de Boltzmann,
 T, es la temperatura,
 η , es la viscosidad del medio, y
 R, es el radio hidrodinámico de las especies en difusión.

Según su tamaño medio, los nanosistemas podrán ser captados por los vasos linfáticos o por las CPA (Irvine and Read, 2020):

- Partículas pequeñas (< 20 nm) drenarán a los capilares sanguíneos y posteriormente se eliminarán.
- Partículas entre 20 y 100 nm drenarán hacia los ganglios linfáticos donde se absorberán por las CPA.
- Partículas más grandes (> 100 nm) probablemente permanezcan en los sitios de inyección hasta que sean capturadas y transportadas a los ganglios linfáticos por las CPA.

4.2.2. Carga superficial

El potencial zeta es un parámetro que nos informa sobre la carga superficial de las nanopartículas, de ahí que pueda indicar si un material cargado es encapsulado en el centro de la nanopartícula o en la superficie (Gómez-Gaete, 2014).

Por otro lado, se ha averiguado que debido a que la membrana celular intestinal está cargada negativamente, las nanopartículas cargadas positivamente interactúan con el epitelio intestinal con mayor fuerza, en comparación con las nanopartículas cargadas negativamente o neutras (Alai et al. 2015). Sin embargo, se ha demostrado que la carga negativa de las nanopartículas aumenta su eliminación en la sangre en comparación a las nanopartículas con carga positiva o neutras (Nandhakumar et al., 2017).

Así, la carga catiónica es un factor importante para retener el nanosistema en el sitio de administración. Liu y colaboradores explicaron que los liposomas catiónicos se agregan y producen en el lugar de administración un efecto de depósito tanto de ellos mismos como de los antígenos durante un período prolongado de tiempo (Liu et al., 2019b).

A mayor valor absoluto del potencial zeta, mayor es la cantidad de carga en la superficie de la partícula y la posibilidad de que se originen interacciones repulsivas pudiendo ocasionar

nanosuspensiones más estables, debido a que se evita la formación de aglomerados. De ahí, que el potencial zeta sea también, por tanto, un índice de estabilidad de las partículas en suspensión (Mayoral et al., 2014). Varios estudios han demostrado que las partículas con un potencial zeta por encima de ± 30 mV son estables en suspensión (Vogel et al., 2017).

Esa carga superficial de los nanosistemas juega además un papel importante en la excreción de los nanosistemas del cuerpo, ya que si no se excretan o no se degradan se acumularán en órganos y tejidos pudiendo ocasionar efectos adversos. El aclaramiento renal a través de los riñones es responsable de la eliminación de nanopartículas menores de 8 nm, influyendo la carga superficial en su facilidad de excreción siguiendo un orden de carga negativa > carga neutra > carga positiva. Esto es debido a la carga negativa que presentan las membranas.

Sin embargo, el aclaramiento biliar a través del hígado permite la excreción de nanopartículas mayores de 200 nm, influyendo la carga superficial de modo que cuando se encuentra aumentada presentan una mayor distribución en hígado (Zhao et al., 2014).

4.2.3. Morfología de las partículas

Se ha demostrado en varios estudios que la forma de las nanopartículas es un factor que afecta a la penetración celular. Además, es un factor importante en el comportamiento *in vivo* y la función biológica, ya que influye especialmente en la internalización de las nanopartículas en las células. Por ejemplo, una comparación en la biodistribución de nanopartículas de oro pegiladas, unas en forma de barra y sus otras esféricas mostró que los nanopartículas de oro en forma de barra fueron captadas en menor medida por el hígado y los macrófagos, mostrando tiempos de circulación más largos y una mayor acumulación en el tejido tumoral en comparación con las nanopartículas esféricas (Baetke et al., 2015).

Otros estudios han demostrado que las nanopartículas esféricas son capaces de producir una respuesta inmune más fuerte que las nanopartículas con forma de varilla o disco (Pati et al., 2018).

Por otro lado, las diferentes presentaciones morfológicas también mejoran la vehiculización del fármaco en la zona de interés. Así mismo, partículas esféricas presentan mejor penetración en el tejido, mientras que los nanotubos o las fibras presentan mejor retención (Li et al., 2019).

Un estudio demostró la distribución dependiente de las formas de las nanopartículas donde las nanopartículas de barra corta se encontraban predominantemente en el hígado mientras que las barras largas se encontraban en el bazo. Produciéndose así una excreción más rápida en las varillas cortas que las largas (Zhao et al., 2014).

En conclusión, durante la producción de los nanosistemas usados en vacunas, debe tenerse en cuenta que las partículas esféricas presentan mejor internalización celular en comparación con partículas no esféricas (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

4.2.4. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad juega un papel importante en la interacción con las proteínas solubles y células inmunes a través del reconocimiento de restos hidrofóbicos. Por tanto, influye en el destino *in vivo* de las nanopartículas (Pati et al., 2018).

En diversos estudios se han demostrado que las nanopartículas poliméricas hidrofóbicas son inductoras potentes de las citoquinas y moléculas coestimuladoras, en comparación con las nanopartículas poliméricas hidrófilas (Pati et al., 2018). Por tanto, la inducción de citoquinas conlleva a la activación de macrófagos produciendo un aumento de la capacidad fagocitaria y por consiguiente en las respuestas inmunitarias.

Por tanto, la composición de los nanosistemas es uno de los principales factores de influencia en la biodisponibilidad de las nanopartículas; así por ejemplo, se sabe que la asociación de polímeros hidrofílicos con los nanosistemas va a aumentar su vida útil en el cuerpo. Sobre todo, el uso de polímeros como el polietilenglicol (PEG) destacó debido a que se ha demostrado que aumenta la biodisponibilidad y estabilidad del nanosistema en el cuerpo (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

4.3. Principales nanosistemas utilizados en la fabricación de vacunas

Muchos estudios han demostrado que los nanosistemas actúan como sistema de liberación de vacunas mejorando la inmunogenicidad de los nuevos antígenos recombinantes y además permitiendo la administración a través de vías no invasivas como las mucosas o la administración transdérmica, ayudando además a mejorar la cobertura inmunológica (González-Romo and Picazo, 2015)

A continuación, se despliega una descripción de los principales nanosistemas que se han estudiado como vehículos de vacunas, clasificados como ya se ha citado anteriormente:

4.3.1. Nanosistemas orgánicos

4.3.1.1. Liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares microscópicas de tamaño variable, constituidas por una o más bicapas de fosfolípidos biodegradables y no tóxicos, encerrados en un interior acuoso (Delgado Rubio et al. 2016).

Según su tamaño se clasifican en 'small unilamellar vesicles' (SUVs), siendo estas entre 20 y 50 nm de diámetro, o 'large multilamellar vesicles (MLVs), oscilando entre 1 y 2,5 μm (Vitas et al., 2017). Se puede visualizar esta diferencia en la siguiente imagen (**Figura 5**):

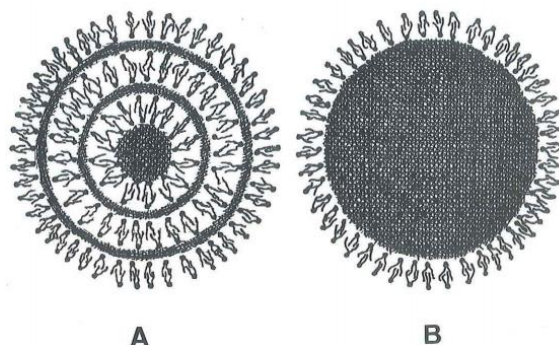


Figura 5. Diferencias de liposomas según su tamaño. A: SUVs y B: MLVs (Vitas et al., 2017).

Estas vesículas son capaces de atrapar el antígeno, citoquina o gen, para introducirlos en el cuerpo, sin que se produzcan respuestas inmunes de rechazo (Pedroza-Roldan et al. 2018). Las capas de lípidos que presentan estos liposomas encapsulan los antígenos y actúan como sistemas liberadores en ciertas células, e incorporan glicoproteínas de la envoltura viral para formar virosomas.

Los virosomas se caracterizan por ser un cruce entre liposomas y partículas similares a virus (VLP), son estructuras con proteínas de la cápside viral en la superficie liposómica que les permite una fusión efectiva con la membrana de la célula diana (Bhardwaj et al., 2020).

Por otro lado, los liposomas se caracterizan por su composición en fosfolípidos que aumenta la capacidad de las CPA para fagocitar las partículas, aumentando el procesamiento y la presentación del antígeno. Al igual que pueden transportar adyuvantes externos o tenerlos incorporados en sus membranas provocando respuestas inmunes más fuertes (Karch and Burkhard, 2016).

Además, la carga superficial liposómica desempeña un papel importante en la respuesta inmune de la vacuna, es decir, liposomas cargados positivamente inducen respuestas más fuertes que los liposomas cargados negativamente, ya que interactúa de forma más eficiente con los macrófagos y células presentadoras de antígenos (Wen et al., 2019).

En este sentido, se ha estudiado que los fosfolípidos pueden producir cambios en el contenido aniónico de la membrana, y así contribuir a la carga superficial del liposoma alterándola (Nisini et al., 2018). Por tanto, se puede trabajar con una formulación de liposomas modificados

químicamente en superficie con grupos funcionales, como amina (catiónico) y carboxilo (aniónicos) (Wen et al., 2019).

En la siguiente imagen (**Figura 6**) se puede observar la estructura que pueden construir los fosfolípidos, es decir, micelas o liposomas.

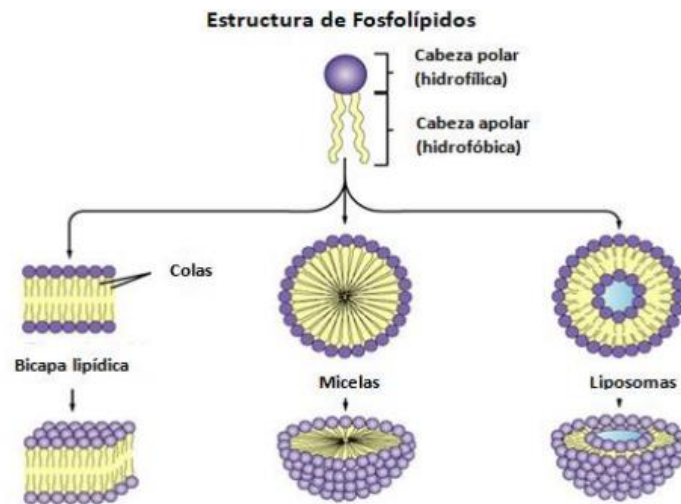


Figura 6. Estructuras que forman los fosfolípidos (<https://naukas.com/2014/09/24/liposomas-la-medicina-del-futuro/>).

Bungener y colaboradores han demostrado el excelente potencial que presentan los liposomas para la entrega de terapias y/o vacunas debido a las siguientes propiedades (Bungener et al., 2017) en base a:

- ✓ Son biocompatibles, biodegradables y bajos / no tóxicos.
- ✓ Son capaces de incorporar componentes hidrofílicos o hidrofóbicos, y es posible el suministro doble de antígeno.
- ✓ Pueden mejorar la solubilidad de los antígenos hidrófobos.
- ✓ Proporcionan una liberación controlada a largo plazo de antígenos encapsulados.
- ✓ Mejoran la estabilidad de los antígenos contra la degradación física y biológica (descomposición enzimática de antígenos peptídicos / proteicos).
- ✓ Se pueden modificar químicamente para unir ligando de orientación a su superficie.
- ✓ Pueden aumentar el tiempo de circulación sistémica de las vacunas.
- ✓ Pueden reducir los efectos secundarios inespecíficos de la terapéutica encapsulada, mejorando así su índice terapéutico.

- ✓ Pueden presentar múltiples copias de epítomos.
- ✓ La naturaleza de los liposomas ayuda en la presentación cruzada de antígenos que generan respuestas de células T citotóxicas (CTL) específicas de antígeno, lo cual es particularmente importante en el desarrollo de vacunas contra virus y cánceres.

Principalmente destacan dos características para la utilización de liposomas en la elaboración de vacunas (Bungener et al., 2017):

Primero, la encapsulación de antígenos en los liposomas, los convierte en solubles y así pueden ser capturados por las CPA. Así, esta presentación puede ser captada a través de las principales moléculas del complejo de histocompatibilidad para activar a los linfocitos T CD4 + y CD8 + para activar el sistema inmunitario adaptativo. Además, tras la activación, las CPA producen las citoquinas necesarias para activar el sistema inmunitario innato y adaptativo.

En segundo lugar, pueden proporcionar un efecto de depósito y así conseguir una retención a largo plazo y liberación sostenida de antígenos en el sitio de administración. No obstante, ocasionaría no solo respuestas Th2, sino que también una respuesta inmune dependiente de Th1. Esto proporciona protección contra patógenos intracelulares donde la inmunidad dependiente de anticuerpos es inadecuada.

En resumen, una ventaja destacable que presenta la formulación de vacuna en liposomas es que una vez que han sido absorbidas por las células intestinales, se absorben y se transportan por el sistema linfático. De este modo, produce una minimización del efecto del metabolismo de primer paso ocasionando un aumento de concentración de la vacuna en sangre sistémica, y con ello, aumenta la biodisponibilidad y la vehiculización en el lugar de acción (Ghosh et al., 2019).

4.3.1.2. Micelas

Las micelas son estructuras formadas por copolímeros anfifílicos que se autoensamblan en agregados nanométricos por encima de la concentración micelar crítica (Alai et al., 2015).

En comparación con los liposomas y VLP que presentan núcleos hidrófilos, como se indica en la **Figura 7**, las micelas poseen un núcleo hidrofóbico (Smith et al., 2015), y una superficie hidrofílica llamada 'corona' (Facciola et al., 2019).

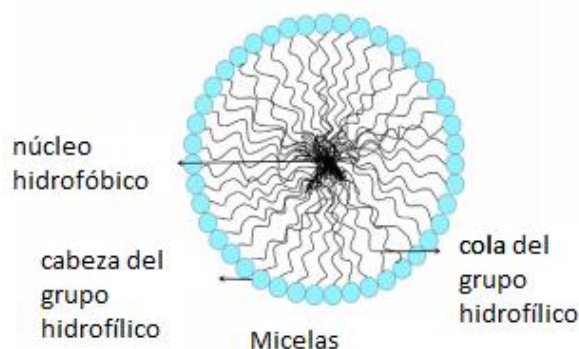


Figura 7. Estructura de las micelas (Yan et al., 2020).

Las micelas pueden presentar diferentes formas, composición y tamaños que afectan al potencial de activación inmune. Se caracterizan por tener un tamaño de partícula de 10-100 nm (Saeedi et al., 2019), lo que facilita el suministro de antígenos a las células presentadoras de antígenos, especialmente las células dendríticas.

Los antígenos se pueden conjugar con micelas de dos maneras diferentes. Se unen covalentemente a la superficie micelar, es decir, a la corona hidrofílica; o se conjugan con la variedad de colas de alquilo para formar micelas de péptidos anfifílicos (Bhardwaj et al., 2020). Estos péptidos anfifílicos son una clase de biomaterial, compuestos por péptidos unidos a las colas de alquilo hidrófobas, que en medio acuoso se autoensamblan y forman la estructura micelar (Facciola et al., 2019).

El método de conjugación se ha utilizado para micelas basadas en polímeros cargadas con adyuvante para unir vacunas contra el VIH, que pueden producir una fuerte activación de las células presentadoras de antígenos *in vitro*. Por tanto, el adyuvante actúa uniéndose preferentemente a la albúmina y fluye a los ganglios linfáticos, aumentando la probabilidad de desencadenar la aparición de células T. Al igual que las micelas no sólo son capaces de interactuar con las células dendríticas en el sitio de inyección sino que llegan al sistema linfático y así hasta los ganglios linfáticos (Facciola et al., 2019).

Un estudio demostró que las micelas de péptidos anfifílicos cilíndricos o de forma esférica contienen las cantidades correctas de antígenos y adyuvantes anfifílicos, y pueden alcanzar eficientemente los ganglios linfáticos. Al igual que también ejercen un papel importante como vacuna anticancerígena (Facciola et al., 2019).

4.3.1.3. Nanovacunas a base de proteínas biomiméticas

Las proteínas biomiméticas son proteínas de origen viral. Presentan cápsides virales autoensambladas desprovistas de material genético y se clasifican como partículas similares a virus (VLP) (Bhardwaj et al., 2020).

Se trata de nanopartículas de autoensamblaje no infecciosas, ya utilizadas para el desarrollo de vacunas virales. Están equipadas por una cubierta viral externa, caracterizada por epítopos repetitivos los cuales el sistema inmunitario reconoce como una estructura no propia.

Destaca su similitud con los virosomas, pero la diferencia entre ambas, es que los virosomas poseen una pequeña concentración de ciertas proteínas virales en la superficie de los liposomas, mientras que las VLP se parecen a la estructura tradicional del virus excepto que no tiene material genético viral que los haga infeccioso o capaz de replicarse (Smith et al., 2015).

Su tamaño normalmente oscila entre 20-800 nm para la aplicación en vacunas (Facciola et al., 2019). Son eficaces para provocar respuestas inmunes tanto en el linfocito T como en el linfocito B pero su capacidad producir anticuerpos está incrementada cuando se administra con otros adyuvantes en conjunto, como las sales de aluminio (Pedroza-Roldan et al., 2018).

Las VLP presentan una serie de ventajas que incluyen (Shirbaghaee and Bolhassani, 2016)

- No necesitan propagar organismos patógenos.
- Estructuras de superficie repetitivas y ordenadas, es decir, son una o más proteínas estructurales que se puede organizar en una o varias capas, y en algunos casos, la partícula está envuelta por una membrana lipídica.
- De naturaleza multivalente y particulada.
- Más seguros en comparación con otros nanosistemas.
- Estable en condiciones ambientales externas, dependiendo de la estructura VLP (es decir, envoltente o no).
- Útil como portador para expresar el antígeno extraño.

Las VLPs presentan un potencial característico para atacar a las células dendríticas y así activa las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Las partículas entre 20 y 200 nm estimulan las células CD4+ y CD8+ generando respuestas Th1 mayoritariamente.

En su contribución para la elaboración de vacunas destaca su utilidad como nuevas estrategias para la elaboración de vacunas de aplicación en mucosas; debido a su pequeño tamaño y

composición química de superficie, minimizan las interacciones adhesivas hidrofóbicas y electrostáticas con el moco.

En varios estudios han logrado elaborar vacunas basadas en VLP como contra el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus del papiloma humano (VPH) (Giese, 2014). En 1986, se comercializó la primera vacuna VLP para el VHB, administrada en poblaciones sanas (Zhao et al., 2014).

A continuación, se muestran varios ejemplos de estructuras de VLP en distintas enfermedades con sus respectiva proteína expresada (**Figura 8**).

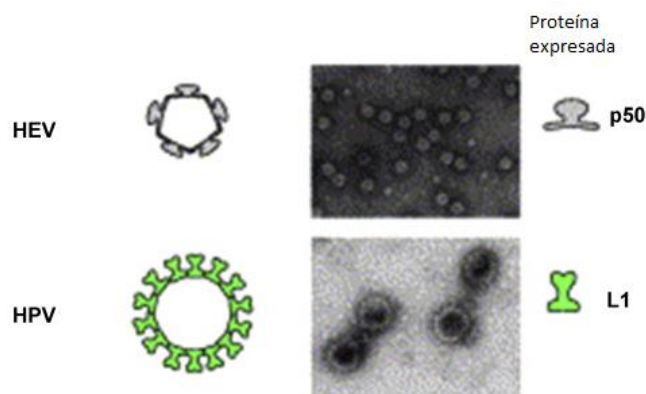


Figura 8. Diferentes estructuras de partículas similares a virus. Las partículas similares a virus pueden derivar de una variedad de virus como podemos ver; HEV, virus de la hepatitis E; VPH, virus del papiloma humano (Zhao et al., 2014).

4.3.1.4. Nanopartículas poliméricas

Son sistemas coloidales formados por polímeros naturales o sintéticos. Hay dos tipos de nanopartículas poliméricas con distintas propiedades de liberación: nanoesfera y nanocápsulas (Peres et al., 2017).

Las nanoesferas son nanoestructuras de tipo matricial en las que el fármaco está física y uniformemente dispersado. Mientras que las nanocápsulas son nanosistemas vesiculares en los que el fármaco es vehiculado en una cavidad interna rodeada por una membrana polimérica. La siguiente imagen (**Figura 9**) ilustra la diferente estructura de nanoesferas y nanocápsulas.

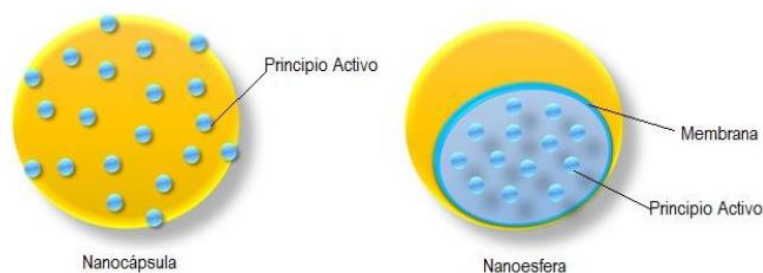


Figura 9. *Diferencias de distribución del fármaco entre nanoesfera y nanocápsula*
https://www.researchgate.net/figure/Estructura-fisica-de-las-nanoparticulas-y-su-interaccion-con-el-principio-activo_fig1_337679532.

En términos generales, la formulación de este tipo de nanosistema basado en nanopartículas permite una mayor eficacia de transfección que las formulaciones de micropartículas (partículas de tamaño > 1 micra).

Existen varios métodos de elaboración de estas nanopartículas poliméricas según se pretenda la encapsulación de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, y se deseen desarrollar nanopartículas simples o compuestas. Estos métodos se pueden clasificar en los de elaboración directa y aquellos a base de polímeros preformados (Urrejola et al., 2018a).

El método más usado es la técnica de emulsión- evaporación. Consiste en la emulsión de dos fases, una acuosa con un agente emulsificante, y una fase orgánica inmiscible en agua, con un principio activo y un polímero que formará la matriz. Una vez formada la emulsión, se evapora el solvente orgánico, que deber ser volátil. El polímero precipita y encapsula los principios activos hidrofóbicos.

También destacan diferentes métodos de elaboración como:

- ✓ Método de doble o múltiple emulsión, permitiendo encapsular moléculas hidrófilas gracias a la doble emulsión.
- ✓ Método de difusión de emulsificación.
- ✓ Método de nanoprecipitación.

Para la producción de nanopartículas poliméricas, el polímero más usado y exitoso es el polilactida (PLA), polímero biodegradable y biocompatible in vivo que ha sido ampliamente estudiado, al igual que el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), alginato, quitosano, gelatina, ácido hialurónico, policaprolactona (PCL) y celulosa polianiónica (PAC) (Bollhorst et al., 2017). Sin embargo, para la administración de vacunas los más usados son PLGA y PLA (Pati et al., 2018).

Aunque las nanopartículas de PLGA están cargadas negativamente, pueden ser cargadas positivamente mediante la adición de ligandos catiónicos como por ejemplo, el quitosano (Torres-Sangiao et al., 2016).

Respecto a la administración en vacunas de nanosistemas formado por nanopartículas poliméricas de PLA, se ha estudiado que protegen frente a enzimas plasmáticas, y producen una liberación sostenida y dirigida de antígenos y adyuvantes asociados a bacterias, virus y tumores *in vivo*, desencadenando así diferentes respuestas inmunes. Destacan así como un polímero prometedor para el desarrollo de potentes sistemas de administración de vacunas contra patógenos y cáncer (Urrejola et al., 2018a).

Varios estudios concluyeron que la PEGilación de los nanosistemas tienen especial interés en la elaboración de nanovacunas debido a que prolonga la vida media de las mismas en la circulación sistémica, y ofrecen alta capacidad de administrar vacunas de ADN plasmídico (pADN), mejorando la expresión del antígeno *in vivo* más de 55 veces (Tejeda-Mansir et al., 2019).

En general, los liposomas y las nanopartículas compuestas por polímeros biodegradables como PLGA, estudiados como portadores de vacunas, presenta una serie de limitaciones como son que incluyen bajos niveles de antígeno encapsulado, frecuentemente utilizan disolventes orgánicos en el proceso de elaboración y, en ocasiones, no evitan la desnaturalización de las estructuras tridimensionales de los antígenos relacionadas con la producción de la respuesta inmune (Urrejola et al., 2018).

4.3.2. Nanosistemas inorgánicos

Aunque la mayoría de estos nanosistemas de naturaleza inorgánica no son biodegradables, la principal ventaja que presentan recae en su estructura rígida y su síntesis controlable (Zhao et al., 2014). Dentro de este grupo, destacan los siguientes tipos de nanosistemas.

4.3.2.1. Nanotubos de carbono (CNT, por las siglas en inglés)

Como su nombre indica, se trata de nanosistemas compuestos completamente de carbono. Existen varios tipos, nanotubos de carbono de pared simple (SWNT) o de pared múltiple (MWNT), siendo estos últimos más grandes y constituidos por muchos nanotubos de pared simple apilados unos dentro del otro de forma concéntrica. Todo esto se indica en la imagen **(Figura 10)** que se muestra a continuación.

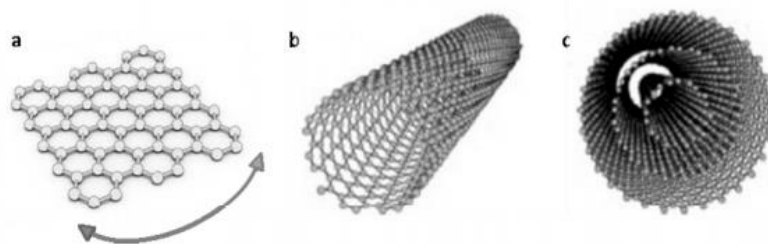


Figura 10. Representación molecular de nanotubos: lámina de grafeno que se enrolla para formar los nanotubos (a), nanotubos de pared simple (b) y nanotubos de pared múltiple (c) (<http://www.scielo.br/pdf/cr/v44n10/0103-8478-cr-44-10-01823.pdf>).

Por otro lado, los nanotubos son poco reactivos químicamente, y están constituidos por carbono puro.

Respecto a su tamaño, los nanotubos de pared simple presentan longitudes variables por encima de los 100 nm, mientras que los de pared múltiple varían de 2 a 50 nm (Urrejola et al., 2018a).

También se consideran miembros de la familia de los nanotubos de carbono los fullerenos, que se diferencian entre sí por el número de átomos de carbono. Presentan propiedades fisicoquímicas únicas haciéndolos candidatos ideales para la administración y vehiculización de fármacos, pero tienen poca capacidad de dispersión, provocando un inconveniente. Por ello, en los últimos años se han desarrollado varios enfoques de vehiculización de medicamentos aumentando la solubilización de los CNT y aumentando su biocompatibilidad (Tekade et al., 2017)

Ambos tipos de nanotubos son muy útiles en la administración de vacunas, ya que muestran mejor rendimiento para la activación del complemento, la adsorción de proteínas y la generación de la respuesta inmunitaria (Beg et al., 2018). Diferentes estudios han demostrado que los CNT inducen inmunoestimulación in vitro e in vivo (Gómez-Gallego et al., 2016).

Algunos investigadores señalan que este tipo de nanosistemas puede usarse con dos fines: i) como vehículo para vacunas por su capacidad de unión al antígeno mientras mantiene su conformación, y así inducir una respuesta de anticuerpos específicos de antígeno; y ii) como nanovectores para suministrar antígenos formando enlaces covalentes o conjuntos supramoleculares basados en interacciones no covalentes. Siendo estos nanovectores similares a un patógeno en términos de tamaño, son reconocido por las CPA del sistema inmune calificado, drenando a los ganglios linfáticos y activando a las células inmunes (Giese, 2014).

4.3.2.2. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro presentan propiedades ópticas y electrónicas totalmente dependientes de su forma y tamaño (Gómez-Gallego et al., 2016). Tienen especial importancia el sistema de nanopartículas a base de oro, carbono, hierro y sílice (Anselmo and Mitragotri, 2015).

La síntesis química de nanopartículas de oro necesita la reducción de sales de oro, como AuCl_3 , para obtener el oro que constituirá el núcleo del nanosistema.

Inicialmente, el procedimiento más importante es a través de la reducción de citrato de tetracloruro de hidrógeno (III) (HAuCl_4) en agua hirviendo, y así se obtiene las nanopartículas de oro. Esta síntesis hace hincapié en el citrato trisódico por su doble función, actuando como agente reductor para promover la reducción de Au^{3+} a Au^0 , y agente estabilizador al adsorberse en la superficie de los coloides de oro formados y estabilizarlos electrostáticamente un entorno acuoso (Ahmad et al., 2017). Igualmente se han realizado muchos estudios basados en la síntesis química de las nanopartículas de oro debido a la diversidad en tamaño, forma y funcionalización de la superficie.

De forma general las nanopartículas de oro presentan una relación superficie-volumen alta, son biocompatibles e inertes, y se pueden funcionalizar fácilmente con varias moléculas, por ello, juegan también un papel importante en el campo de las vacunas como adyuvantes. Ha podido comprobarse que cuando las nanopartículas de oro actúan como adyuvantes en vacunas, reducen la toxicidad y mejoran la actividad inmunogénica proporcionando estabilidad en el almacenamiento de la vacuna, pudiéndose almacenar a temperatura ambiente a diferencia de las vacunas tradicionales que deben cumplir la cadena de frío (Carabineiro, 2017).

Otra ventaja que presentan estos nanosistemas respecto a las vacunas tradicionales es que son personalizables, teniendo un significado funcional desde una perspectiva inmunológica. Es decir, después de la inyección y según el intervalo de tamaño que presente las nanopartículas de oro interactuarán con el tejido linfóide primario o secundario, y finalmente desencadenarán la respuesta inmunológica, siguiendo una ruta metabólica u otra (Comber y Bamezai, 2015).

Por ello, se pueden sintetizar en varias formas y tamaños (Comber y Bamezai, 2015) según los requerimientos del paciente o del tipo de vacuna; destacando las nanopartículas de oro de formas esféricas, varillas, cúbicas, etc con un intervalo de tamaño de 2-150 nm (Zhao et al., 2014).

Gracias a su tamaño relativamente pequeño (generalmente <100 nm), las nanopartículas de oro se acumulan preferentemente en las células, sobre todo, en las células inmunes ya que estas son las que interactúan con partículas y materiales extraños al organismo.

La característica más prometedora en el ámbito de elaboración de vacunas a partir de estas nanopartículas de oro, es el control sobre sus propiedades fisicoquímicas que influye en la capacidad de llegar a las células y tejidos diana (Ahmad et al., 2017).

4.3.3. Otros nanosistemas

4.3.3.1. Nanoemulsiones

Se entiende por emulsión aquel sistema disperso heterogéneo formado por dos fases líquidas inmiscibles; una fase interna líquida dispersa en el seno de una fase externa líquida.

En una nanoemulsión las gotículas de la fase interna tienen un tamaño comprendido en la escala nanométrica. Al presentar un tamaño sumamente pequeño, mejorarán la absorción y la biodisponibilidad, haciendo que se puedan usar dosis más reducidas y se minimicen los efectos adversos.

Normalmente, el tamaño de la gota de fase interna de una nanoemulsión está entre 0.1 y 500 nanómetros (Requena, 2018). El reducido tamaño de la gota y la menor tensión superficial entre las moléculas de distinta naturaleza que componen la nanoemulsión, contribuyen a que apenas se aglomeren o precipiten debido a la reducida posibilidad de migración o de sedimentación de las gotículas de fase dispersa interna.

En conclusión, las nanoemulsiones son más estables y translúcidas que las emulsiones y microemulsiones. Para su empleo en el campo de la elaboración de medicamentos o de vacunas, una de las características que se les exige es que los surfactantes utilizados sean biodegradables.

Como otros nanosistemas, las nanoemulsiones pueden actuar específicamente en las células o tejidos diana; por ejemplo, cuando se aplican en el tratamiento del cáncer actúan en las células cancerosas produciendo una mínima interferencia con las células sanas, siendo esto una gran ventaja.

Las nanoemulsiones presentan dos ventajas como sistemas de administración de vacunas; la posibilidad de incluir sustancias para mejorar la absorción transdérmica de compuestos lipofílicos y la presencia de potenciadores de la penetración como los tensioactivos. Estas

vacunas son mayormente administradas por vía tópica debido a las composiciones que presentan (Chircov and Grumezescu, 2019).

Recientemente se ha publicado un estudio basado en la elaboración de una vacuna frente al virus de la influenza aviar altamente patógena, constituida por una nanoemulsión denominada NE02, para administración intramuscular. NE02 es una nanoemulsión formulada con un tensioactivo catiónico de cadena doble. Los resultados demostraron que NE02 es un adyuvante de emulsión seguro, inmunogénico y presenta poca toxicidad por vía intramuscular; concluyéndose que se puede usar de forma estable con otros adyuvantes para producir una vacuna eficaz (Wang et al., 2020).

4.4. Nanovacunas en fase de investigación y aprobadas

Se muestra una serie de vacunas elaboradas a partir de diferentes nanosistemas, cuyo desarrollo se encuentra en fase de investigación (**Tabla 2**):

Tipo de Nanosistema	Elemento principal	Nombre de la vacuna	Enfermedad	Fase clínica
Poliméricos	PLGA	-	Hepatitis B	Ensayo clínico
Poliméricos	Quitosano	-	Tuberculosis	Preclínico
Inorgánico	Oro	-	Influenza	Ensayo clínico
A base de lípidos	Liposoma	-	Malaria	Fase I/ II
VLP	Péptido autoensamblados	Vacuna nasal	Hepatitis B	Fase III

Tabla 2. *Diferentes nanovacunas en fase de investigación.* Fuente: Elaboración propia con referencia en (Bhardwaj et al., 2020).

En ocasiones, estas investigaciones han culminado en la aprobación de vacunas basadas en nanosistemas, algunos ejemplos se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 3**):

Tipo de nanosistema	Elemento principal	Nombre de la vacuna	Enfermedad
VLP	Péptido autoensamblados	Enerix [®]	Hepatitis B (Monovalente)
Nanoemulsión (agua en aceite)	A base de lípidos	CimaVax- EGF [®]	Cáncer de pulmón de células no pequeñas

VLP	Péptidos autoensamblados	Ambirix [®]	Hepatitis B y A (Bivalente)
VLP	Péptidos autoensamblados	Gardasil [®]	Virus del papiloma humano (VPH), cáncer de cuello uterino.

Tabla 3. *Diferentes nanovacunas aprobadas.* **Fuente:** Elaboración propia con referencia en (Bhardwaj et al., 2020; Facciola et al. 2019; Rosa et al. 2017).

4.5. Resumen nanosistemas

Nanosistema	Material/es	Carga	Ventajas	Desventajas
Liposomas	Bicapa de fosfolípidos.	Encapsulado dentro del núcleo hidrofílico.	Capacidad para transportar fármacos hidrófilos o hidrófobos, biocompatibles, biodegradables, estables, posibilidad de funcionalización de la superficie.	Altamente sensible a cambios estructurales y naturaleza de carga útil. Alto coste de producción. Tóxico porque el medicamento puede filtrarse o desplazarse al torrente sanguíneo.
Micelas	Partículas coloidales nanométricas, generalmente esféricas, con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico.	Síntesis anfifílica.	Núcleo hidrofóbico que puede cargar drogas no hidrofílicas.	Pobre estabilidad.
VLP	Autoensamblaje de proteínas de la cápside biocompatibles, carecientes del ácido nucleico infeccioso.	Nanopartículas de autoensamblaje.	Seguros, estables a condiciones externas ambientales, naturaleza multivalente y	Dificultad de ampliación y necesidad de purificación.

			estructura semejante a los virus de los que proceden.	
Nanopartículas poliméricas (nanoesferas y nanocápsulas)	Matriz sólida de polímero hidrofóbico con núcleo acuoso opcional (nanocápsula).	Embebido en la matriz polimérica o dentro del núcleo.	Alta capacidad de carga, capacidad de carga flexible, perfiles de liberación fiables, evita la fuga del medicamento.	Difíciles de purificar y pobres propiedades de la tienda.
Nanotubos de carbono	Grafito dispuesto en conformación de hoja o cilíndrico.	Unido a la columna vertebral del carbono.	Propiedades fototérmicas y ópticas innatas, alta capacidad de carga superficial.	Pobre biodegradabilidad, acumulación en los órganos, baja solubilidad y toxicidad.
Nanopartículas de oro	Partículas sólidas de oro típicamente recubierto con polietilenglicol.	Fijado a la superficie / revestimiento de la superficie.	Propiedades fototérmicas y ópticas innatas.	Problemas de estabilidad fisiológica, rápidos índices de depuración. Costoso coste de fabricación.
Nanoemulsiones	Dos fases líquidas inmiscible, donde la fase interna presenta tamaño nanométrico.	Portador esfera sólida con superficie amorfa, lipofílica y carga negativa.	Transparencia, estable, lleva fármacos tanto hidrofóbicos como lipofílicos.	Tiende a separar la fase interna por mecanismos de desestabilización y presentan toxicidad.

Tabla 4. Resumen de los diferentes nanosistemas con sus respectivos materiales usados, carga, ventajas y desventajas que presentan (Richards et al., 2016; Saleem et al., 2019; Yan et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

- I. La nanotecnología es una ciencia que está aportando grandes beneficios a la medicina actual. En el campo de las nanovacunas aún falta mucho por investigar, ya que, a pesar de todos los estudios realizados, la mayoría de vacunas están en fases tempranas de desarrollo y no todas tienen la misma probabilidad de ser desarrolladas con éxito en un período de tiempo no inferior a 5 años.
- II. Uno de los problemas que presentan el uso clínico de nanosistemas es la biocompatibilidad debido a la toxicidad que generan en el organismo algunas formulaciones, destacando las de carácter inorgánico.
- III. Gracias a las nanovacunas se van a generar respuestas amplificadas, robustas y específicas en comparación con las vacunas tradicionales. Provocando además una liberación controlada y prolongada en el sitio de acción. Al igual que permiten administrarse por diferentes vías de administración como son las vía oral y nasal.
- IV. Debido a su tamaño nanométrico, estos nanosistemas formados por nanopartículas no pueden ocasionar embolia en el cuerpo penetrando así con mayor facilidad en numerosas barreras fisiológica al igual que las interacciones con las biomoléculas tanto en superficie como en el interior de las células se encuentran facilitada.
- V. Su elaboración a base de materiales biodegradables facilita su eliminación del organismo, posibilitando con ello, una reducción de posibles toxicidades.

ABREVIATURAS:

CLT: Células T citotóxicas específicas de antígenos

CNT: Nanotubos de carbono

CPA: Células presentadoras de antígenos

IFN- γ : Interferón γ

MLVs: Large multilamellar vesicles

MWNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

NK: Células asesinas o Natural Killer

PAC: Celulosa polianiónica

pADN: Vacunas de ADN plasmídico

PEG: Polietilenglicol

PLA: Polilactida

PLGA: Ácido poliláctico-co-glicólico

SUVs: Small unilamellar vesicles

SWNT: Nanotubos de carbono de pared simple

Th1: Respuestas T Helper 1

Th2: Respuestas T Helper 2

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHE: Virus de la Hepatitis E

VHP: Virus del Papiloma Humano

VLP: Partículas similares a virus

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad S, Zamry AA, Tan HTT, Wong KK, Lim JK, Mohamud R. Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A review on the cellular uptake and subsequent immunological properties. *Mol Immunol* [Internet]. 2017;91(June):123–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.001>
- Al-Halifa S, Gauthier L, Arpin D, Bourgault S, Archambault D. Nanoparticle-based vaccines against respiratory viruses. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):1–11.
- Alai MS, Lin WJ, Pingale SS. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. Vol. 23, *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier Taiwan LLC; 2015. p. 351–8.
- Anselmo AC, Mitragotri S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *AAPS J*. 2015;17(5):1041–54.
- Baetke SC, Lammers T, Kiessling F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol*. 2015;88(1054).
- Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(2):106–14.
- Beg S, Rahman M, Jain A, Saini S, Hasnain MS, Swain S, et al. Emergence in the functionalized carbon nanotubes as smart nanocarriers for drug delivery applications. In: *Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach*. Elsevier; 2018. p. 105–33.
- Bhardwaj P, Bhatia E, Sharma S, Ahamad N, Banerjee R. Journal Pre-proof Advancements in Prophylactic and Therapeutic Nanovaccines. *Acta Biomater* [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 9]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.020>
- Bollhorst T, Rezwan K, Maas M. Colloidal capsules: Nano- and microcapsules with colloidal particle shells. Vol. 46, *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry; 2017. p. 2091–126.
- Bose RJ, Kim M, Chang JH, Paulmurugan R, Moon JJ, Koh WG, et al. Biodegradable polymers for modern vaccine development. *J Ind Eng Chem* [Internet]. 2019;77:12–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.04.044>
- Bungener L, Huckriede A, Wilschut J, Daemen T. Virosomes as a vaccine delivery system [Internet]. *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development*. Elsevier Inc.; 2000. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4/00012-9>
- Cambronero MR, Prado-Cohrs D, Lopez Sanroma M. Conceptos inmunológicos básicos aplicados a la vacunología. *Vacunas* [Internet]. 2017;18(2):49–58. Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.vacun.2017.10.001>
- Carabineiro SAC. Applications of gold nanoparticles in nanomedicine: Recent advances in vaccines. *Molecules*. 2017;22(5).
 - Catarina CS. www.foroconsultivo.org.mx. 2019;52(55).
 - Chircov C, Grumezescu AM. Nanoemulsion preparation, characterization, and application in the field of biomedicine [Internet]. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. Elsevier Inc.; 2019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816200-2.00019-0>
 - Coronado MJ. Componentes y tipos de vacunas. Univ Huelva [Internet]. 2017;15. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-1>
 - D. Comber J, Bamezai A. Gold Nanoparticles (AuNPs): A New Frontier in Vaccine Delivery. *J Nanomedicine Biotherapeutic Discov*. 2015;05(04).
 - Delgado Rubio Ó, José de JESÚS VALLE M, Sánchez Navarro A, José Jesús Valle Y Amparo Sánchez Navarro M De. Diseño de una formulación de liposomas para la administración de vacunas = Design of a Liposomal Formulation Aimed to Vaccines Administration. 2016;1(1):53–60.
 - Department of Health and Human Services (HHS). Vaccine Types | Vaccines [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 25]. Disponible en: <https://www.vaccines.gov/basics/types>
 - Diaz-Arévalo D, Zeng M. Nanoparticle-based vaccines. *Nanopharmaceuticals*. 2020;135–50.
 - Facciola A, Visalli G, Laganà P, La Fauci V, Squeri R, Pellicanò GF, et al. The new era of vaccines: The “nanovaccinology.” *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(16):7163–82.
 - Gheibi Hayat SM, Darroudi M. Nanovaccine: A novel approach in immunization. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12530–6.
 - Ghosh S, Ghosh S, Sil PC. Role of nanostructures in improvising oral medicine. Vol. 6, *Toxicology Reports*. Elsevier Inc.; 2019. p. 358–68.
 - Giese M. *Molecular Vaccines*. Vol. 1, *Molecular Vaccines*. 2014.
 - Gómez-Gaete C. Palabras Claves: Nanomedicina, Nanotecnología, Nanopartículas, Vectorización, Drug Delivery Systems. Vol. 7, *Polímeros*. *Rev. Farmacol. Chile*. 2014.
 - Gómez-Gallego D, Urcuqui-Inchima S, Hernández J. Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina. *Iatreia*. 2016;29(4):445–57.
 - Gómez Garzón M. Therapeutic uses of nanomaterials and nanoparticles. *Repert Med y cirugía*. 2019;28(1):5–11.
 - González-Romo F, Picazo JJ. El desarrollo de nuevas vacunas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015;33(8):557–68. Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.013>
- Guerrero Arellano H, Caicedo Salazar J, Guerrero Zambrano E. La Nanotecnología farmacéutica es una realidad. *Dominio las Ciencias*. 2017;3(2):526–38.
 - Importancia LA, Desarrollo DESU, La EN, Cruz A, Karen A, Cortes B, et al. Vacunas, la importancia de su desarrollo en la actualidad.
 - Irvine DJ, Read BJ. Shaping humoral immunity to vaccines through antigen-displaying nanoparticles. Vol. 65, *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1–6.
 - Kim MG, Park JY, Shon Y, Kim G, Shim G, Oh YK. Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2014;9(5):227–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>
 - Li C, Wang J, Wang Y, Gao H, Wei G, Huang Y, et al. Recent progress in drug delivery. 2019 [cited 2020 Apr 6]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003>
 - Liu J, Miao L, Sui J, Hao Y, Huang G. Nanoparticle cancer vaccines: design considerations and recent advances. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2019;(xxxx). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.10.006>
 - Mayoral JB, Moreno AC, San Martín-Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas I. INTRODUCCIÓN. *Latin-American J Phys Educ*. 2014;8(4).
 - Nandhakumar S, Dhanaraju MD, Sundar VD, Heera B. Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *Bull Fac Pharmacy, Cairo Univ*. 2017 Dec 1;55(2):249–58.
 - Negahdaripour M, Golkar N, Hajighahramani N, Kianpour S, Nezafat N, Ghasemi Y. Harnessing self-assembled peptide nanoparticles in epitope vaccine design. Vol. 35, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2017. p. 575–96.
 - Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Front Immunol*. 2018;9(FEB).
 - Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Front Immunol*. 2018;9(OCT).
 - Pedroza-Roldan C, Elizondo-Quiroga D, Cárdenas-Vargas A. Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción Vaccine adjuvants: types, applications and mode of action. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2018;(March 2017).
 - Peres C, Matos AI, Coniot J, Sainz V, Zupančič E, Silva JM, et al. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomater*. 2017;48:41–57.
 - Requena A. EL MUNDO DE LAS NANOEMULSIONES – Academia de Ciencias de la Región de Murcia [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 3]. Disponible en:

- <https://www.um.es/acc/el-mundo-de-las-nanoemulsiones/>
- Richards DA, Maruani A, Chudasama V. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chem Sci* [Internet]. 2016;8(1):63–77. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C6SC02403C>
 - Rosa D, Ruiz F, Lidia O, Pérez C. CIMAvax-EGF[®] : vacuna terapéutica contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados CIMAvax-EGF[®] : Therapeutic Vaccine Against Non-small Cell Lung Cancer in Advanced Stages. 2017;3–4.
 - Rosales-mendoza S, González-ortega O. *Nanovaccines*. 2019.
 - Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K, Dizaj SM. Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. Vol. 111, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 666–75.
 - Saleem K, Khursheed Z, Hano C, Anjum I, Anjum S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: A focus on recent advances and challenges. Vol. 9, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2019.
 - Shirbaghaee Z, Bolhassani A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers*. 2016;105(3):113–32.
 - Smith JD, Morton LD, Ulery BD. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2015;34:217–24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.014>
 - Soema PC, Willems GJ, Jiskoot W, Amorij JP, Kersten GF. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Jul 10;94:427–35.
 - Sulczewski FB, Liszbinski RB, Romão PRT, Rodrigues Junior LC. Nanoparticle vaccines against viral infections. *Arch Virol* [Internet]. 2018;163(9):2313–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3856-0>
 - Tejeda-Mansir A, García-Rendón A, Guerrero-Germán P. Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. *Biotechnol Genet Eng Rev* [Internet]. 2019;35(1):46–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1560552>
 - Tekade RK, Maheshwari R, Soni N, Tekade M, Chougule MB. Nanotechnology for the Development of Nanomedicine [Internet]. *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*. Elsevier Inc.; 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00001-4>
 - Torres-Sangiao E, Holban AM, Gestal MC. *Advanced nanobiomaterials: Vaccines,*

- diagnosis and treatment of infectious diseases. *Molecules*. 2016;21(7):1–22.
- Urrejola MC, Liliam ;, Soto V, Zumarán CC, Juan ;, Peñaloza P, et al. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly) Polymeric Nanoparticle Systems: Structure, Elaboration Methods, Characteristics, Properties, Biofunctionalization and Self-assembly Layer by Layer Technologies. Vol. 36, *Int. J. Morphol.* 2018a.
 - Urrejola MC, Soto L V, Zumarán CC, Peñaloza JP, Álvarez B, Fuentesvilla I, et al. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas I: de Biodetección y Monitoreo de Glucosa en Diabetes a Bioimagen, Nano-Oncología, Terapia Génica, Ingeniería de Tejidos / Regeneración a Nano-Odontología. *Int J Morphol.* 2018b;36(4):1490–9.
 - Vicente S, Sanchez A. Chapter · September 2014. 2014; (September).
 - Vitas A, Díaz R, Gamazo C. Liposomas. Aplicaciones en terapia antimicrobiana. 2017;(2).
 - Vogel R, Pal AK, Jambhrunkar S, Patel P, Thakur SS, Reátegui E, et al. High-Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
 - Wang SH, Chen J, Smith D, Cao Z, Acosta H, Fan Y, et al. A novel combination of intramuscular vaccine adjuvants, nanoemulsion and CpG produces an effective immune response against influenza A virus. *Vaccine [Internet]*. 2020 Apr 23 [cited 2020 Apr 8];38(19):3537–44. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X20303790>
 - Wen R, Umeano AC, Kou Y, Xu J, Farooqi AA. Nanoparticle systems for cancer vaccine. *Nanomedicine*. 2019;8(1):627–48.
 - Yadav HKS, Dibi M, Mohammad A, Srouji AE. Nanovaccines formulation and applications-a review. *J Drug Deliv Sci Technol [Internet]*. 2018;44 (September 2017):380–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.015>
 - Yan X, Zhou M, Yu S, Jin Z, Zhao K. An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. *Vaccine [Internet]*. 2020;38(5):1096–104. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.031>
 - Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. Vol. 32, *Vaccine*. Elsevier; 2014. p. 327–37.