

Asdrúbal Trujillo, Carlos Angulo y Sergio Rosales Mendoza

Vacunas orales contra enfermedades entéricas producidas a partir de plantas

Las infecciones por patógenos entéricos causantes de la diarrea representan un grave problema de salud pública, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Las plantas han mostrado ser una alternativa interesante para la producción, almacenamiento y entrega de vacunas accesibles y de fácil administración, capaces de inducir respuestas inmunes y conferir protección contra estas enfermedades.

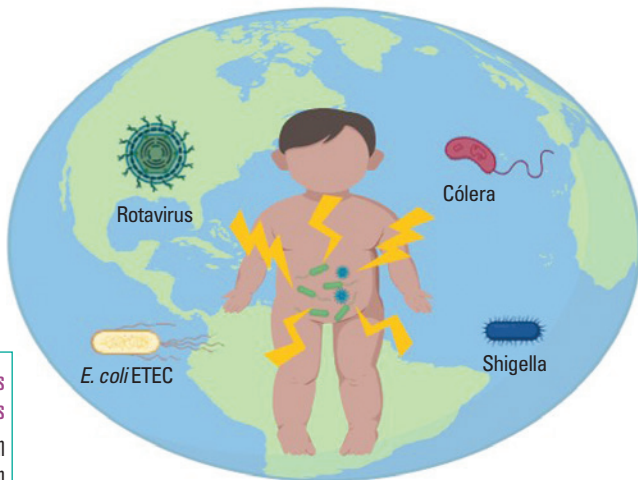
Patógenos entéricos causantes de la diarrea

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que por día hay alrededor de 200 millones de personas que sufren algún tipo de gastroenteritis y al año mueren cerca de 1.6 millones por alguna enfermedad relacionada con la diarrea. Este problema es más común en los países en vías de desarrollo, donde la población menor de 5 años es la más afectada. No obstante, las personas que viajan mucho también suelen presentar este tipo de infecciones, por lo que se conocen como “diarrea del viajero”.

Las enfermedades entéricas son causadas por diversos agentes patogénicos, como virus, protistas o bacterias. Los patógenos más comunes causantes de diarrea son adenovirus, astrovirus, rotavirus, shigella, campylobacterias, salmonela, cólera y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). De éstos, los más mortales son los rotavirus y adenovirus, que causan cerca de 150 000 muertes al año en menores de 5 años, mientras que las bacterias *Shigella* spp., *V. cholerae* y *E. coli* ETEC se relacionan con alrededor de 200 000 muertes por año (Troeger y cols., 2018; Dadonaite y cols., 2018) (véase la Figura 1).

Las infecciones por los patógenos que causan la diarrea son consecuencia de una falta de higiene tanto en el agua como en los alimentos, pero no parece que este problema pueda resolverse en un futuro cercano en ciertas zonas de los países en vías de desarrollo. Hasta ahora, la manera de contrarrestar las infecciones bacterianas es mediante el uso de antibióticos; sin embargo, su consumo indiscriminado ha generado cepas resistentes que han agudizado los problemas de salud





y el difícil acceso a algunas zonas, la distribución y administración se dificultan.

Biofármacos recombinantes

Fármacos de origen biológico que son producidos por un organismo genéticamente modificado.

Antígenos

Sustancias propias o extrañas que son reconocidas por el sistema inmune adaptativo como señal de una infección.

Cadena en frío

Desde la producción, transporte, almacenamiento y venta, se debe mantener una temperatura controlada para preservar las propiedades de las vacunas.

■ **Una alternativa: vacunas orales producidas en plantas**

Ante esta situación, es indispensable desarrollar agentes vacunales que no requieran de la cadena en frío y que puedan aplicarse de una manera fácil; es decir, vacunas que puedan tener mayor cobertura y no sea necesario el uso de jeringas y personal capacitado para su administración. Además, deben inducir una alta protección para disminuir la morbilidad y mortalidad por enfermedades entéricas. Una alternativa interesante para la producción, almacenamiento y entrega de estas vacunas es el uso de plantas.

Para sortear las dificultades mencionadas, se pueden usar plataformas innovadoras para la expresión de **biofármacos recombinantes**, como algunas plantas (véase la Figura 2), que pueden servir como biorreactores de producción de **antígenos** vacunales, matrices adecuadas para la conservación de la vacuna a temperatura ambiente (sistema libre de cadena de frío) y vehículos de entrega por la vía oral. Por su

Figura 1. Las enfermedades entéricas son un problema mundial que afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, en especial a menores de 5 años y turistas. Los patógenos que más causan diarrea son rotavirus, cólera, shigella y *E. coli* enterotoxigénica.

pública. También existen vacunas aprobadas contra cólera y rotavirus, capaces de proteger y disminuir de manera significativa el número de personas enfermas (Troeger y cols., 2018); no obstante, la mayor restricción relacionada con estas vacunas es que necesitan de una **cadena en frío** para llegar a los lugares donde son requeridas, pero debido a la lejanía

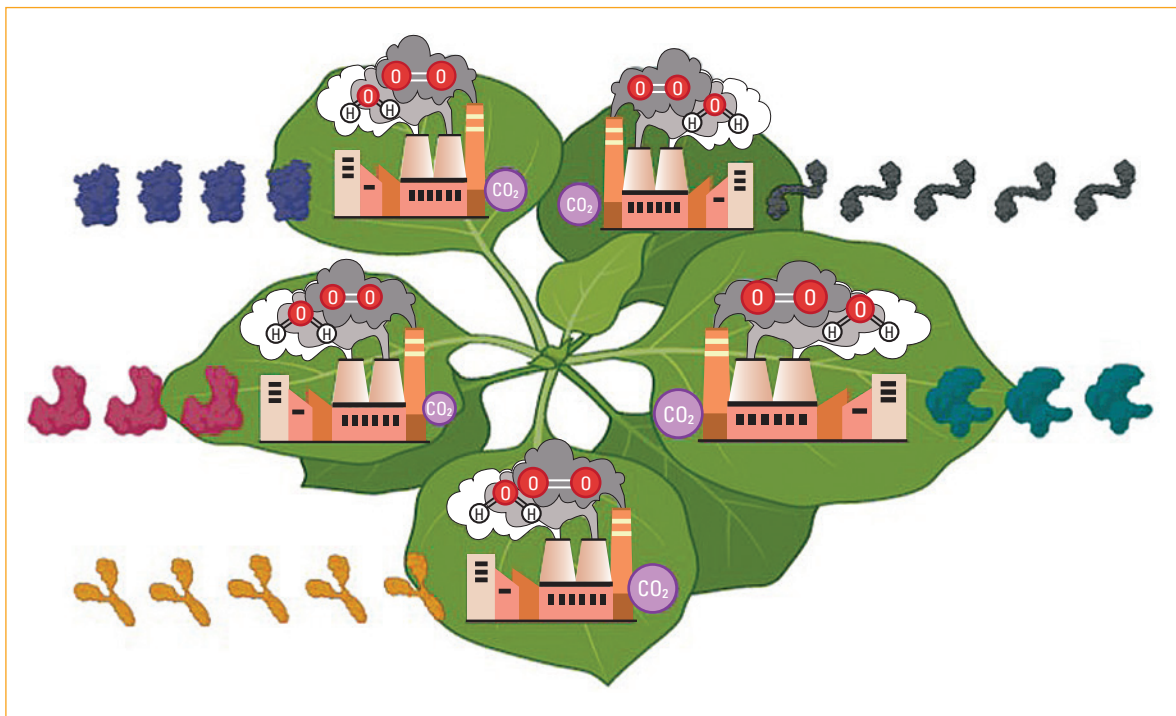


Figura 2. Las plantas genéticamente modificadas son biofábricas que prácticamente sólo requieren de luz y dióxido de carbono (CO₂) atmosférico para producir moléculas de interés, como las vacunas.

naturaleza, la célula vegetal serviría como una biocápsula capaz de proteger la vacuna en su interior para poder atravesar parte del agresivo sistema digestivo hasta que pueda ser entregada directamente a la mucosa intestinal (Rosales Mendoza, 2014). De hecho, ya se están probando en las primeras fases clínicas vacunas producidas en plantas contra diversas enfermedades y administradas oralmente; sin embargo, las vacunas producidas en plantas purificadas para su administración parenteral (inyección) son las que se encuentran en etapas más avanzadas, como es el caso de una vacuna contra la influenza que están produciendo empresas como Medicago® y Fraunhofer CMB (Takeyama y cols., 2015).

Una de las ventajas que ofrece la producción de agentes vacunales en plantas es el uso de la tecnología recombinante o sintética para el diseño de las vacunas subunitarias. Con base en la literatura y programas bioinformáticos se identifican elementos específicos del agente infeccioso (antígenos o epítopes) capaces de generar una respuesta inmune protectora, y con ello se diseña un gen que exprese la vacuna recombinante (el antígeno) dentro del tejido vegetal de la planta modificada genéticamente. Lo anterior implica que se pueden diseñar vacunas que no contengan al patógeno completo, ya sea atenuado o muerto, como por lo regular se hace en las vacunas convencionales.

El diseño de estas vacunas con programas computacionales puede ser muy diverso, ya que es posi-

ble añadir muchos antígenos e incluso otra molécula que funcione como adyuvante (un potenciador de la respuesta inmune). También se pueden añadir antígenos de diferentes patógenos para hacer una vacuna polivalente para proteger contra diferentes enfermedades (véase la Figura 3). Un reto importante es que los antígenos incluidos en la formulación de la vacuna logren ser inmunogénicos, esto es, que sean capaces de inducir una respuesta inmunológica tras su administración; además, los antígenos deben ser seguros y capaces de conferir una protección de amplio espectro contra estos patógenos o alguna enfermedad no transmisible, como el cáncer.

Otra ventaja de estas vacunas es que las plantas producen una gran variedad de compuestos, como polisacáridos, saponinas, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos, que tienen capacidad de adyuvantes para potenciar la respuesta inmune. Aunque existen algunas plantas que contienen sustancias nocivas, como los alcaloides del tabaco o la solanina de la papa, las moléculas activas con propiedades de adyuvante se encuentran en mayor cantidad y tienen muchos más beneficios.

Epítopes
La parte o sitio específico del antígeno que es reconocido por los anticuerpos o las células T.

La respuesta inmune por la vacunación oral

La administración oral de vacunas es más cómoda y no requiere de personal especializado ni materiales estériles. Sin embargo, el reto para estas vacunas es que no deben degradarse en el tracto digestivo,

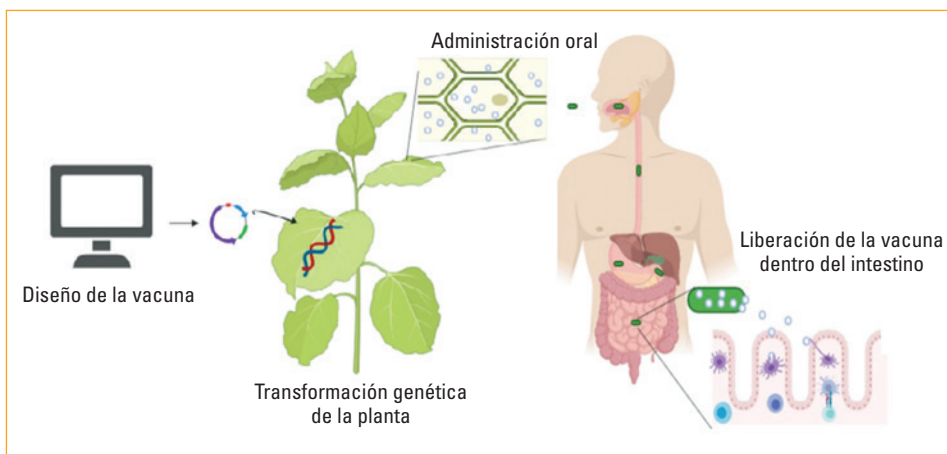


Figura 3. Para la producción de vacunas en plantas se aprovechan las herramientas bioinformáticas y moleculares. El tejido vegetal también permite almacenar y transportar la vacuna en una especie de biocápsula capaz de atravesar el agresivo sistema gástrico.

Células dendríticas

Especializadas en capturar y procesar el antígeno para presentarlo a los linfocitos y disparar una respuesta inmune.

pues necesitan llegar hasta la mucosa intestinal, de tal forma que puedan desencadenar una respuesta sistémica a través del tejido linfoide asociado a los intestinos. Este tejido está por debajo de la mucosa intestinal y es el sitio donde se encuentran las células del sistema inmune (linfocitos B y T) que reconocen el antígeno y generan la respuesta inmune.

Aunque la inmunización oral se puede asociar con la inducción de tolerancia inmune (es decir, que no genere una respuesta), esto se puede superar con el uso de adyuvantes y mediante un esquema de inmunización apropiado. Para que haya una inducción de la respuesta inmune adaptativa (que genera memoria en el organismo para una posible futura infección), el antígeno debe llegar a la superficie de la mucosa intestinal y ser transportado a través del **epitelio**; por lo general, mediante las células M, las cuales pueden llevar el antígeno del lumen intestinal al tejido linfoide.

Epitelio

Tipo de tejido formado por células que están unidas de manera contigua y se caracterizan por recubrir superficies corporales, tanto internas como externas.

También, de manera alternativa, las **células dendríticas** gastrointestinales pueden extender las dendritas transepitelialmente para tomar el antígeno directamente del intestino. Luego lo transportan a los ganglios linfáticos, en donde lo procesan y presentan para establecer la sinapsis inmunológica y desencadenar la activación y diferenciación de linfocitos. Una vez que ya tengan una memoria generada por la vacuna, estas células se encargarán de responder ante una infección verdadera mediante la eliminación del patógeno gracias a la acción de los linfocitos T y las células plasmáticas, los cuales se encargan de producir anticuerpos que eliminan o bloquean al agente infeccioso (véase la Figura 4).

■ **Vacunas producidas en plantas contra patógenos entéricos**

■ Para que exista una protección eficiente contra las enfermedades entéricas es importante que se lleve a

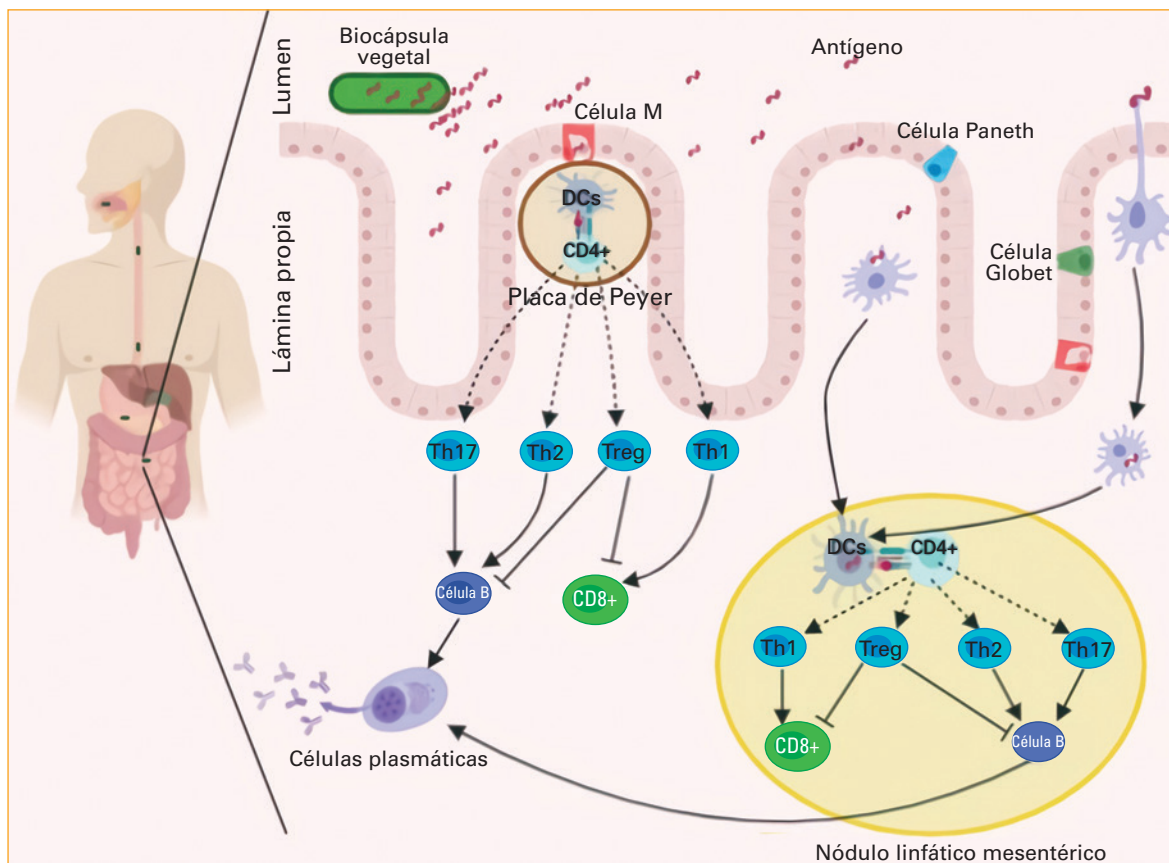


Figura 4. Representación simplificada de los componentes principales del sistema inmune en mucosas y la respuesta generada por un antígeno administrado de manera oral y entregado al intestino por el bioencapsulamiento del tejido vegetal.

cabo la estimulación inmune dentro de los compartimentos intestinales. Por esa razón, el hecho de que algunas plantas sean comestibles las ha convertido en una plataforma de interés para la producción de vacunas, ya que la administración oral es una ruta principal para la inducción de inmunidad en la mucosa intestinal.

En el laboratorio y en fases preclínicas hay en estudio muchas vacunas orales contra los diversos patógenos entéricos. Por ejemplo, en distintos trabajos con plantas como arroz, zanahoria, maíz y papa, se han introducido a las células vegetales los genes que producen las subunidades B de la toxina Termolábil (LT) de *E. coli* ETEC o de la toxina del cólera (CT) de *V. cholerae*. El tejido de estas plantas se ha administrado por la vía oral a animales no humanos como sujetos experimentales y se ha observado la producción de anticuerpos contra estas toxinas; posteriormente, se ha comprobado que están protegidos de la infección cuando son expuestos a esas bacterias (Tacket, 2009).

De manera interesante, también en humanos se ha observado la producción de anticuerpos y protección contra la bacteria *E. coli* ETEC cuando se les administró maíz que contenía la subunidad B de LT (LTB) expresada dentro del tejido de estos vegetales. Cabe mencionar que estas toxinas son prácticamente idénticas y por eso hay una inmunidad cruzada, aunque esto es muy singular porque son bacterias completamente distintas. Es decir, se puede inmuni-

zar contra la toxina del cólera CT si se administra la subunidad de la toxina de *E. coli*, y viceversa.

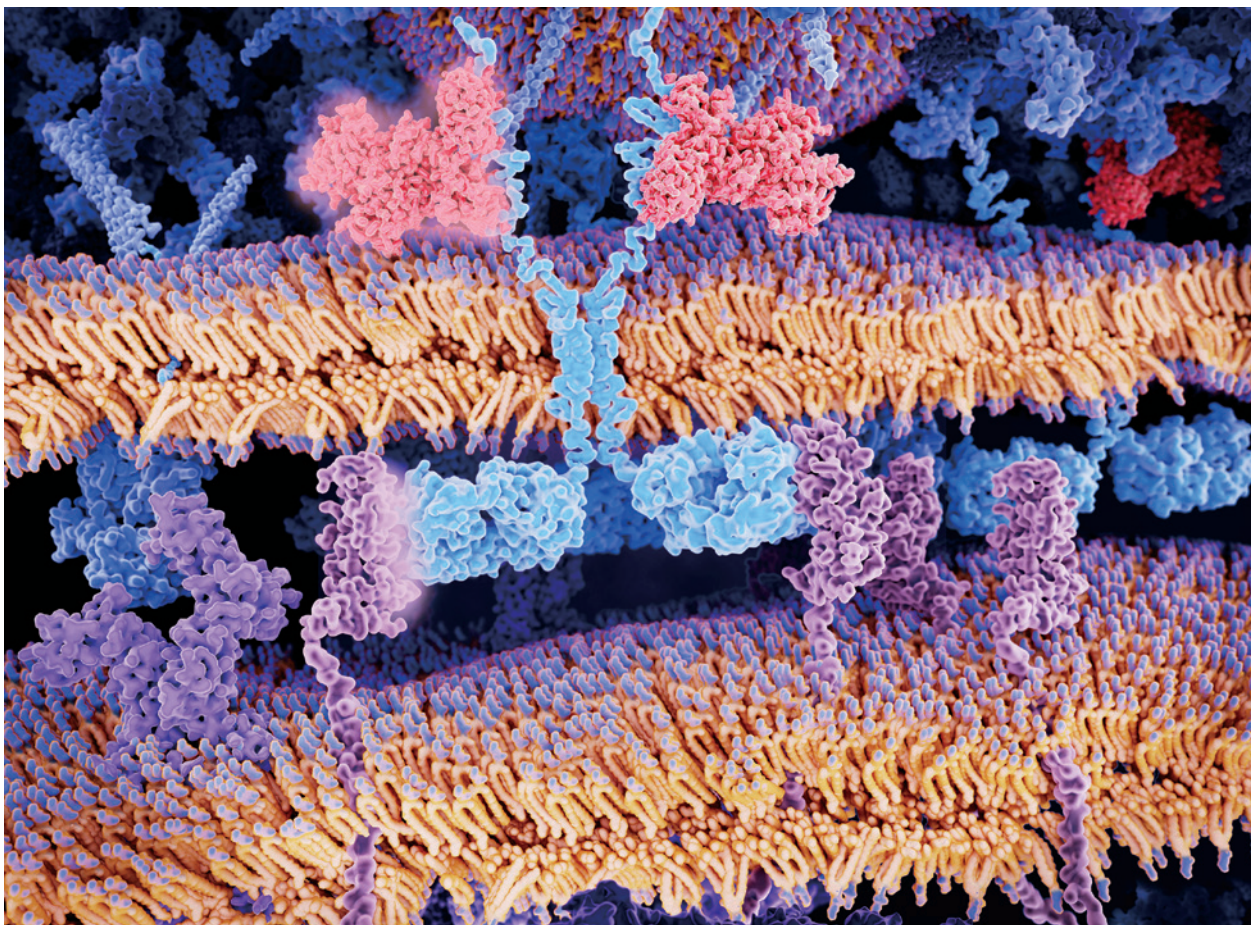
En otros estudios en tejido vegetal de tabaco y zanahoria también se han expresado fusiones de LTB con otras toxinas para abarcar más protección, como es el caso de la fusión de LTB con ST, que es otra toxina de algunas cepas de *E. coli*. No sólo las subunidades de estas toxinas se han utilizado para el diseño de vacunas, sino también otras partes de las bacterias, y se han obtenido los mismos resultados, como factores de colonización y fimbrias, que son elementos de una bacteria que promueven la colonización e invasión al hospedero.

Asimismo, se han estudiado vacunas capaces de proteger contra dos o más patógenos causantes de enfermedades entéricas, dado que las plantas pueden producir **proteínas quiméricas** que contienen antígenos de diferentes patógenos. Por ejemplo, se ha reportado una partícula pseudoviral como producto de la expresión de proteínas de la cápside de los rotavirus fusionadas con la LTB de *E. coli* y se demostró que estas partículas tienen la capacidad de inducir oralmente una respuesta protectora contra rotavirus, *E. coli* y *V. cholerae* (Tacket, 2009). También recientemente se estudió una vacuna producida en plantas de tabaco con antígenos de *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus* capaz de generar una respuesta inmune en ratones a los que se les administró el tejido vegetal vía oral (Trujillo y cols., 2020).

Proteínas quiméricas
Formadas por la traducción de dos genes distintos.

Tabla 1. Vacunas producidas en plantas contra enfermedades entéricas.

Patógeno	Antígeno	Planta	Ruta	Fase	Referencia
<i>V. cholerae</i>	CTB	Arroz	Oral	Fase clínica I	Yuki y cols., 2013
<i>E. coli</i> ETEC	LTB	Maíz	Oral	Fase clínica I	Ozvald y cols., 2008
Rotavirus	Vlps	Lechuga	Intramuscular	Fase clínica I	Medicago, Inc.
<i>E. coli</i> ETEC Rotavirus	Fimbria y vlps de rotavirus	Papa	Oral	Fase preclínica	Lee y cols., 2004
<i>E. coli</i> ETEC	LTB y ST	Tabaco/ zanahoria	Oral	Fase preclínica	Rosales-Mendoza y cols., 2009 y 2011
Rotavirus Salmonella	VP7 y VP4 FljB	Tabaco	Oral	Fase preclínica	Bergeron-Sandoval y cols., 2010
<i>E. coli</i> ETEC <i>V. cholerae</i> <i>S. typhimurium</i> <i>V. parahaemolyticus</i>		Tabaco	Oral	Fase preclínica	Trujillo y cols., 2020



Dos vacunas producidas en plantas contra enfermedades entéricas que están en etapas de experimentación avanzadas (fase clínica I) son la CTB y LTB expresadas tanto en arroz como en maíz, respectivamente. También en fase clínica I hay una vacuna contra el rotavirus (patógeno con que se relacionan más casos de estas enfermedades) a partir de la producción de partículas virales en diversos tejidos vegetales, principalmente lechuga (Takeyama y cols., 2015). Por lo tanto, contamos con mucha evidencia positiva para el uso de vacunas orales producidas en plantas para contrarrestar varias enfermedades entéricas; sin embargo, aún es necesario que se hagan **ensayos clínicos** en fases avanzadas (véase la Tabla 1).

Ensayos clínicos ▶ Evaluación experimental realizada con seres humanos voluntarios para la aplicación de un producto, sustancia, medicamento, técnica diagnóstica o terapéutica.

■ **Conclusión**

■ Estos agentes vacunales contra las enfermedades entéricas han demostrado resultados positivos y son una alternativa viable para superar las limitantes de

las vacunas convencionales, como la cadena en frío que se requiere para el almacenamiento y la distribución. Otro factor favorable es el carácter comestible de las plantas, lo que representa una ventaja para su administración (sin material ni personal especializado) y, más importante, una inmunización oral directa al intestino, donde ocurren las infecciones de este tipo. Además, el carácter racional, sintético y recombinante de la producción de estas subunidades permite diseñar vacunas sin la necesidad de administrar el patógeno muerto o atenuado, lo que las hace más seguras y les da la capacidad de proteger contra diferentes patógenos para disminuir tanto la morbilidad como la mortalidad de estas enfermedades que afectan sobre todo a la población menor de 5 años en los países en vías de desarrollo.

Todavía hay algunos retos para lograr la aprobación de este tipo de vacunas; por ejemplo, se debe hacer una correcta selección de los antígenos y los niveles de expresión dentro de la planta, establecer

una dosis constante (esquema de inmunización) y llevar a cabo la producción de las vacunas de acuerdo con los procedimientos de Buenas Prácticas de Manufactura de las autoridades sanitarias, que en el caso de México es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris). Pese a esas limitantes, las ventajas de este tipo de vacunas son superiores. Las investigaciones actuales están enfocadas en optimizar la transformación genética para lograr una mayor expresión del antígeno en los tejidos comestibles de las plantas y los frutos que se comen crudos (ya que la cocción de la papa, el maíz o el arroz destruiría la vacuna); además, se trabaja en el diseño de vacunas quiméricas y tecnologías para escalar a niveles industriales la producción, con el objetivo de que sean más accesibles y de fácil administración para cubrir las necesidades en los países más afectados.

Asdrúbal Trujillo

Grupo de Inmunología y Vacunología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
 etrujillo@pg.cibnor.mx

Carlos Angulo

Grupo de Inmunología y Vacunología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
 eangulo@cibnor.mx

Sergio Rosales Mendoza

Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
 rosales.s@uaslp.mx

Referencias específicas

- Dadonaite, B., H. Ritchie y M. Roser (2018), "Diarrheal diseases", *Our World in Data*. Disponible en: <<https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases>>, consultado el 23 de agosto de 2020.
- Rosales Mendoza, S. (ed.) (2014), *Genetically Engineered Plants as a Source of Vaccines Against Wide Spread Diseases*, Nueva York, Springer.
- Tacket, C. O. (2009), "Plant-based oral vaccines: results of human trials", *Plant-produced Microbial Vaccines*, 332:103-117.
- Takeyama, N., H. Kiyonoy Y. Yuki (2015), "Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials", *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3(5-6):139-154.
- Troeger, C. et al. (2018), "Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016", *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11):1 211-1 228.
- Trujillo, E., S. Rosales Mendoza y C. Angulo (2020), "A multi-epitope plant-made chimeric protein (LTBentero) targeting common enteric pathogens is immunogenic in mice", *Plant Molecular Biology*, 102(1-2):159-169.