

VACUNAS ANTIVIRALES: ESTRATEGIAS DE ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

María Patricia García-Ramírez, M.Sc.(c)¹, Silvio Urcuqui-Inchima, Ph.D.¹,
Juan Carlos Hernández-López*, Ph.D.^{1, 2}

¹Grupo Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

²Grupo Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia

Recibido: 21 de febrero del 2013. **Aprobado:** 23 de abril del 2013.

***Autor de correspondencia:** Juan Carlos Hernández-López, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia. Calle 48 No. 28-00, Medellín, Colombia. Teléfono: (57-4) 4 446 065 ext. 4233. Correo electrónico: juankhernandez@gmail.com

Cómo citar este artículo: García-Ramírez MP, Urcuqui-Inchima S, Hernández-López JC. Vacunas antivirales: estrategias de activación de la respuesta inmune innata. *Curare*. 2014; 1(1): 43-48.

Resumen. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) constituyen uno de los principales componentes de la inmunidad innata, y son los encargados de detectar la presencia de agentes patógenos a través de los componentes específicos de los microorganismos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). La estimulación de los PRR induce una respuesta inflamatoria que favorece el control inicial de las infecciones y el posterior establecimiento de la inmunidad adaptativa. De esta manera, se genera una memoria inmunológica, responsable de proporcionar una mejor respuesta en encuentros posteriores con el mismo patógeno. Este es el principio en el que se basan las vacunas.

Para lograr su objetivo, las vacunas necesitan activar la inmunidad innata, y es por eso que frecuentemente se utilizan adyuvantes, los cuales aumentan la eficacia de la vacunación. Los PRR desempeñan un papel muy importante en dicho proceso, ya que su estimulación con los adyuvantes conlleva a la activación/maduración de células presentadoras de antígenos, como es el caso de las células dendríticas. Además, la estimulación de los PRR conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, las cuales favorecen el establecimiento de la respuesta inflamatoria y la presentación antigénica.

La presente revisión discute aspectos clave en el entendimiento de las estrategias de inmunización y el papel de los PRR, incluyendo la descripción de los principales PRR implicados en la respuesta vacunal, y su uso como adyuvantes.

Palabras clave: adyuvantes, inflamación, inmunidad innata, receptores de reconocimiento de patrones, vacunas.

ANTIVIRAL VACCINES: STRATEGIES FOR ACTIVATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE

Abstract. Pattern Recognition Receptors (PRRs) are among the main components of innate immunity. They act to detect pathogenic microbes through microorganism-specific components known as Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Stimulation of PRRs induces inflammatory response, which favors both infection control during the early stages as well as the later progress of adaptive immunity. In this way, immune memory is established and provides a better response to further encounters with the same pathogen. This is the principle upon which vaccines are based.

Vaccines need to activate innate immunity to achieve their aim, which accounts for the frequent use of adjuvants to improve the efficacy of vaccines. PRRs play a very important role in this process, as their stimulation triggers the activation/maturation of antigen presenting cells such as dendritic cells. Furthermore, stimulation of PRRs leads to pro-inflammatory cytokine production (TNF- α , IL-1 β , IL-6) which favors inflammatory response and antigen presentation.

This review presents key aspects for understanding immunization strategies and the role of PRRs, including descriptions of the PRRs involved in the vaccine response and their use as adjuvants.

Keywords: adjuvants, inflammation, innate immunity, pattern recognition receptors, vaccine.

VACINAS ANTIVIRAIS: ESTRATÉGIAS DE ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA

Resumo. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) constituem um dos principais componentes da imunidade inata e são os encarregados de detectar a presença de agentes patógenos por meio dos componentes específicos dos micro-organismos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). A estimulação dos PRR induz uma resposta inflamatória que favorece o controle inicial das infecções e o posterior estabelecimento da imunidade adaptativa. Dessa maneira, gera-se uma memória imunológica, responsável por proporcionar uma melhor resposta em encontros posteriores com o mesmo patógeno. Este é o princípio no qual se baseiam as vacinas.

Para atingir seu objetivo, as vacinas precisam ativar a imunidade inata, e é por isso que frequentemente se utilizam adjuvantes, os quais aumentam a eficácia da vacinação. Os PRR desempenham um papel muito importante nesse processo, já que sua estimulação com os adjuvantes leva à ativação/amadurecimento de células que apresentam antígenos, como é o caso das células dendríticas. Além disso, a estimulação dos PRR conduz à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, as quais favorecem o estabelecimento da resposta inflamatória e a apresentação antigénica.

Na presente revisão, discutem-se aspectos-chave no entendimento das estratégias de imunização e o papel dos PRR, o que inclui a descrição dos principais PRR implicados na resposta de vacinação e seu uso como adjuvantes.

Palavras-chave: adjuvantes, inflamação, imunidade inata, receptores de reconhecimento de padrões, vacinas.

Introducción

Uno de los principales objetivos de la vacunación es disminuir la mortalidad causada por diferentes agentes infecciosos e incrementar la calidad y la esperanza de vida de la población mundial. Hasta el momento, la vacunación constituye uno de los mayores logros en el campo de la salud, y sin duda su implementación significó un hecho sin precedentes en la historia de la humanidad [1-4]. Son muchas las dificultades que se han presentado durante el desarrollo de las diferentes vacunas antivirales, pues se han tenido que sortear una gran cantidad de sucesos que incluyen la evasión del sistema inmune por parte de los virus a través de diferentes mecanismos que interfieren con la adecuada respuesta inmune, la efectividad de la vacuna en relación con una rápida respuesta, y hasta los efectos secundarios que puedan llegar a tener durante su aplicación. Sin embargo, los avances científicos recientes en métodos que permiten estudiar la respuesta del sistema inmune frente a infecciones virales han permitido un mejor entendimiento de los mecanismos inmunes que van desde la activación celular, a través de diferentes vías de señalización, hasta el desarrollo de memoria inmunológica, con el fin de establecer nuevos protocolos para el desarrollo de vacunas [1-5].

Los mecanismos de infección, replicación y persistencia de los virus en el hospedero son consecuencia del comportamiento de los virus, que tienen la capacidad de aprovechar la célula y su maquinaria para preservar y mantener su ciclo replicativo, y asegurar así el éxito de la infección y producción de la nueva progenie viral. Dicha conducta viral es la que se ha tenido en cuenta para el desarrollo de vacunas, introduciendo modificaciones a nivel estructural del virus, la inactivación viral o el empleo de virus recombinantes [3].

La mayoría de las vacunas se han desarrollado con el fin de simular una infección natural que genere una respuesta inmune de memoria. Para esto es necesario causar una infección aguda limitada que conduzca a la activación de los diferentes componentes del sistema inmune, responsables de inducir la respuesta inflamatoria y posterior producción de anticuerpos neutralizantes o de una respuesta celular efectora, dando como resultado una respuesta de memoria inmunológica para una protección eficaz ante un determinado agente patógeno.

Entre los principios que guían el desarrollo de las estrategias de inmunización se encuentran:

- i) la inducción de la respuesta inmune es más eficiente cuando el inmunógeno es presentado por una célula presentadora de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas;
- ii) las respuestas adaptativas de tipo humoral y celular participan en el control de las infecciones virales, aunque su intensidad y duración puede variar dependiendo del tipo de virus;
- iii) la polarización de la respuesta inmune puede ser manipulada a favor tanto de la respuesta tipo Th1 (respuesta celular) o Th2 (respuesta mediada por anticuerpos), dependiendo del inmunógeno administrado, la ruta de inmunización y el uso de adyuvantes;
- iv) la presentación de antígenos en órganos linfoides asociados a mucosas induce inmunidad local, que se considera una barrera efectiva para los virus que invaden mucosas [1-7].

Finalmente, la naturaleza y las características del antígeno (virus inactivado o virus atenuado), así como el origen de estos (proteínas purificadas o proteínas recombinantes), determinan las características de la respuesta inmune que se efectuará y su eficiencia.

Adyuvantes inmunológicos

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad inmunomoduladora es uno de los principales objetivos en la investigación inmunológica, con el fin de mejorar las estrategias de inmunización y ampliar las posibilidades a nuevos agentes infecciosos, para los cuales no se dispone aún de vacunas exitosas [8].

Los adyuvantes tienen como propósito potenciar la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y las que se encuentran en fase experimental, para generar una respuesta inmune duradera, de tipo celular o humoral [6]. Son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados de manera simultánea, hacen más efectiva la respuesta inmune. Dichos compuestos se unen a diferentes receptores presentes en la membrana de las células del sistema inmune innato, e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias y promueven la presentación antigénica, a través de la inducción de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (HLA-II) y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 [3-6, 9-11]. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa encargada del reconocimiento de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), presentes en

los microorganismos, con el fin de activar la respuesta inflamatoria y promover el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, mediada por los linfocitos T y B [2-5, 12, 13].

Uno de los adyuvantes más empleados desde el inicio de la inmunoterapia y vacunación ha sido el hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, el cual presenta carga positiva, lo que permite su unión a proteínas cargadas negativamente y débilmente básicas. Las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno contribuyen a la adsorción de los antígenos en las mezclas que contienen hidróxido de aluminio [$Al(OH)_3$] como adyuvante [6, 14]. Sin embargo, el uso repetitivo de $Al(OH)_3$ puede generar anticuerpos de tipo IgE, desencadenando reacciones alérgicas [6, 8], razón por la cual su uso en la actualidad, como adyuvante en las vacunas, ha sido restringido [15, 16].

Otros compuestos de naturaleza química variable se han empleado como adyuvantes, e incluyen los liposomas, las saponinas, las emulsiones de aceite mineral y la vitamina E, entre otros [17, 18]. Sin embargo, estos pueden causar efectos adversos y reacciones alérgicas como consecuencia de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad. Por tal razón, las vacunas de nueva generación emplean adyuvantes diferentes a los tradicionales, los cuales disminuyen la frecuencia de reacciones adversas y contribuyen a la activación rápida de la inmunidad [6, 8].

Las vacunas sintéticas o recombinantes se han usado exitosamente en los últimos años. Sin embargo, uno de los principales problemas con las nuevas vacunas antivirales sintéticas es que presentan baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas tradicionales, basadas en agentes virales intactos, atenuados o inactivados [19]. De ahí la importancia de encontrar nuevos adyuvantes que incrementen la efectividad de las nuevas vacunas. Con base en el conocimiento que se tiene hasta el momento sobre la manera como actúan los receptores de la inmunidad innata al ser estimulados por sus respectivos ligandos, y cómo esta puede potenciar la respuesta inmune a través de i) la producción de citoquinas proinflamatorias; ii) el reclutamiento de células inmunes; y iii) el aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, que facilitan el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T y la subsecuente activación de los linfocitos B para la producción de anticuerpos, se ha sugerido el empleo de algunos ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como adyuvantes [4-6, 9, 14].

Los PRR constituyen los principales mecanismos de reconocimiento de microorganismos, por parte de las células de la inmunidad innata, incluidas células NK, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales, entre otras. La estimulación de los PRR trae como consecuencia la activación de vías de señalización que favorecen la producción de citoquinas y quimioquinas que potencian la maduración de las células presentadoras de antígenos, para inducir la respuesta inmune adaptativa [2, 12, 20-22].

Los receptores de la inmunidad innata mejor descritos hasta la fecha incluyen: i) los receptores tipo toll (TLR), proteínas altamente conservadas que se expresan en la membrana plasmática y en los endosomas, facilitando así el reconocimiento de microorganismos intra y extracelulares (tabla 1); ii) las proteínas RIG-I/MDA-5, y iii) la familia de receptores tipo NOD (NLR) [23, 24].

Tabla 1. Receptores tipo toll y sus ligandos

Receptores tipo toll	Ligando
TLR [‡] 1	Lipoproteínas
TLR2	Zimosán, peptidoglicanos, lipoproteínas, glicolípidos
TLR3	♦RNA de doble cadena
TLR4	Lipopolisacárido
TLR5	Flagelina
TLR6	Zimosán, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de micoplasmas
TLR7 y TLR8	RNA de cadena sencilla, imidazoquinolinas
TLR9	□DNA hipometilado, oligonucleótidos con motivos [‡] CpG
TLR10	Desconocido

‡ TLR: receptores tipo toll; ♦RNA: ácido ribonucleico; □DNA: ácido desoxirribonucleico; [‡]CpG: región de DNA rica en los nucleótidos citosina y guanina.

Fuente: elaboración propia

Hasta el momento el uso de agonistas de los PRR en las estrategias de vacunación ha mostrado una reducción en la toxicidad y un aumento en la potencia de la vacuna en comparación con los adyuvantes tradicionales [15, 16, 25]. Por tal razón, los agonistas de los PRR representan una estrategia efectiva y segura para el desarrollo de las vacunas. El diseño de este tipo de vacunas se basa en la estimulación de la respuesta inflamatoria, que activa las células dendríticas, encargadas de la presentación antigénica e inducción de la respuesta inmune adaptativa [6, 8].

Papel de los TLR en respuesta a las vacunas antivirales

Las vacunas antivirales contienen virus vivos atenuados o inactivados (sin capacidad replicativa) o componentes virales. Sin embargo, a excepción de las vacunas de virus vivo atenuado, las otras dos estrategias (virus inactivados o componentes virales) no simulan una infección natural y, por ende, en ausencia de respuesta inflamatoria, no se genera una respuesta de memoria efectiva que pueda conferir protección frente a una infección futura. Por tal razón, el uso de agonistas de los TLR como inductores de la respuesta inflamatoria ha demostrado su efectividad en las estrategias de vacunación exitosa [26, 27].

El empleo de ligandos de los TLR como adyuvantes es un modelo que actualmente se está empleado en el desarrollo de vacunas antivirales [20]. Tal es el caso de la vacuna contra el virus de la Hepatitis B (HBV), Fendrix®, en la cual se emplea como adyuvante el monofosforil lípido A (MPL), un agonista de TLR4, que aumenta el título de anticuerpos neutralizantes, en comparación con individuos vacunados con la misma vacuna pero en la que se utiliza $Al(OH)_3$ como adyuvante [28, 29]. De forma similar se han reportado varios estudios con ODN-CpG (oligodeoxinucleótidos con motivos CpG) los cuales estimulan TLR9 y favorecen la producción de interferón tipo I, citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y citoquinas reguladoras como IL-10 [28, 29]. Este tipo de adyuvantes se ha utilizado en nuevas formulaciones de las vacunas contra el HBV, las cuales se encuentran en estudios clínicos fase II y fase III, y han reportado mayores títulos de anticuerpos neutralizantes, los cuales aparecen dos semanas después de la inmunización y son más duraderos, acompañados de una mayor respuesta de células citotóxicas, comparados con las formulaciones sin adyuvantes [30].

Otro aspecto interesante es la reducción del número de dosis de la vacuna, ya que al activar eficientemente la respuesta inmune desde las etapas tempranas de la inmunización, se disminuye la necesidad de aplicar dosis complementarias para completar los esquemas y, a largo plazo, la necesidad de utilizar refuerzos en poblaciones con baja prevalencia del patógeno en estudio, lo cual representa ventajas económicas para los programas y las políticas de salud a nivel mundial.

Adyuvantes de TLR7 y TLR8 también se han estudiado con este propósito. Tal es el caso de las imidazoquinolinas, que inducen la producción de citoquinas,

incluyendo IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α [31]. Además estimulan la proliferación de los linfocitos B y la activación de células NK, células de Langerhans, linfocitos Th1 y linfocitos T citotóxicos. Por lo anterior, se han postulado como estrategia adyuvante en vacunas en desarrollo para el VIH-1, llevadas a cabo en modelos murinos, en las cuales se emplean vacunas de DNA recombinante con imiquimod (molécula del tipo imidazoquinolina), obteniendo mejores respuestas antivirales, mediadas por la producción de anticuerpos neutralizantes y la activación de células citotóxicas [32].

El virus de influenza, para el cual se prepara una vacuna anual, según las cepas circulantes, también ha sido motivo de estudio en la búsqueda de nuevos adyuvantes. Los ODN-CpG han demostrado ser seguros, tolerables e inductores de una rápida respuesta inmune evidenciada por la alta producción de anticuerpos específicos desde la segunda semana de inmunización, acompañada de respuesta celular desde la tercera semana, comparado con el grupo control vacunado sin adyuvante [33]. Dicho efecto parece estar mediado por la activación de las células dendríticas plasmacitoides, las cuales expresan altos niveles de TLR9 e IFN- α [12, 34].

Una de las vacunas más efectivas para el control de infecciones virales ha sido la vacuna contra el virus de la fiebre amarilla, el cual causa una enfermedad tropical febril, potencialmente mortal, que es transmitida por mosquitos. En el contexto de esta enfermedad se ha reportado que la inmunización induce la expresión de TLR3 y TLR9 en células NK, así como de los marcadores de activación CD38, HLA-DR/DQ/DP, lo que se traduce en una mayor producción de IFN- γ [35]. Además, esta vacuna puede potenciar la expresión de TLR en otras subpoblaciones celulares del sistema inmunológico, como las células dendríticas, que expresan una gran variedad de estos receptores y que representan el puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida [36].

Estos hallazgos indican que la activación de receptores de la inmunidad innata, como los TLR, desempeña un papel fundamental en el establecimiento de una respuesta inmune protectora. Sin embargo, es necesario conocer si existe un sinergismo entre los diferentes receptores de la inmunidad innata una vez que estos son estimulados por sus respectivos ligandos, y si esto influye de manera positiva en la inducción de una respuesta inmune de memoria, a nivel celular y humoral.

Conclusión

La detección y el reconocimiento temprano de patógenos a través de PRR presentes en las células que participan en la respuesta inmune innata, como las células dendríticas y los macrófagos, facilita la rápida producción de citoquinas implicadas en la respuesta inmune inflamatoria y antiviral, las cuales favorecen el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Este control es mediado gracias a diferentes mecanismos, que incluyen la producción de citoquinas, la maduración de las células presentadoras de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras.

Los principales hallazgos descritos hasta la fecha en el campo de la vacunación contra las enfermedades infecciosas de origen viral sugieren la importancia de profundizar nuestros conocimientos en la elaboración de las nuevas vacunas, las estrategias actuales para su diseño, y el uso de nuevos adyuvantes que estimulen los receptores de la inmunidad innata, para aumentar la eficiencia y la eficacia de las vacunas contra agentes infecciosos como los Virus de Hepatitis C, Dengue y VIH-1, que se han convertido en un gran problema de salud pública a nivel mundial, con repercusiones en todas las esferas de la vida [9, 37].

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación a través del proyecto No. 111549326099; al Programa de Sostenibilidad Universidad de Antioquia (2009-2011), y al Grupo Infettare de la Universidad Cooperativa de Colombia.

Referencias bibliográficas

- [1] Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: A narrative of vaccine discoveries. *Vaccine*. 2000; 18: 1436-47.
- [2] Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine*. 2008; 43: 336-41.
- [3] Nathanson N, Harriet L. Viral vaccine: Viral pathogenesis and immunity. 2005; 235-49.
- [4] Waldmann TA. Immunotherapy: Past, present and future. *Nat Med*. 2003; 9: 269-77.
- [5] Beverley PC. Immunology of vaccination. *Br Med Bull*. 2002; 62: 15-28.
- [6] Mutwiri G, Gerdt V, Lopez M, Babiuk LA. Innate immunity and new adjuvants. *Rev Sci Tech*. 2007; 26: 147-56.
- [7] Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, Dow S. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing tlr3 or tlr9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol*. 2006; 176: 7335-45.
- [8] Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*. 2007; 13: 552-9.
- [9] Kieny MP, Excler JL, Girard M. Research and development of new vaccines against infectious diseases. *Am J Public Health*. 2004; 94: 1931-5.
- [10] Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: No impact of mhc class i and class ii targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine*. 2009; 27: 2128-37.
- [11] Ishii KJ, Akira S. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *J Clin Immunol*. 2007; 27: 363-71.
- [12] Montoya CJ. Vision integral de la inmunidad innata. En: Rugeles MT, Montoya CJ, editores. *Inmunología, una ciencia activa*. Medellín, Universidad de Antioquia. 2009; 1: 58-90.
- [13] Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*. 2005; 11: S63-8.
- [14] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1589: 1-13.
- [15] Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol*. 2004; 2: 497-505.
- [16] Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004; 22: 3658-68.
- [17] Alving CR, Rao M, Steers NJ, Matyas GR, Mayorov AV. Liposomes containing lipid a: An effective, safe, generic adjuvant system for synthetic vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11: 733-44.
- [18] Garçon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of as03, an adjuvant system containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11: 349-66.
- [19] Nabel GJ. Designing tomorrow's vaccines. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 368: 551-60.
- [20] Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. 2004; 5: 975-9.
- [21] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of tlr7-mediated recognition of single-stranded rna. *Science*. 2004; 303: 1529-31.
- [22] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004; 5: 971-4.

- [23] Hernández JC, Montoya CJ, Urcuqui-Inchima S. The role of toll-like receptors in viral infections: Hiv-1 as a model. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2007; 27: 280-93.
- [24] Hernández JC, Urcuqui-Inchima S. Activación y regulación del inflammasoma nlrp3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*. 2012; 25: 380-90.
- [25] Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 198: 513-20.
- [26] Hedayat M, Takeda K, Rezaei N. Prophylactic and therapeutic implications of toll-like receptor ligands. *Med Res Rev*. 2012; 32: 294-325.
- [27] Fujita Y, Taguchi H. Overview and outlook of toll-like receptor ligand-antigen conjugate vaccines. *Ther Deliv*. 2012; 3: 749-60.
- [28] Dupont J, Altclas J, Lepetic A, Lombardo M, Vázquez V, Salgueira C, Seigelchifer M, Arndtz N, Antunez E, von Eschen K, Janowicz Z. A controlled clinical trial comparing the safety and immunogenicity of a new adjuvanted hepatitis b vaccine with a standard hepatitis b vaccine. *Vaccine*. 2006; 24: 7167-74.
- [29] Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the tlr4 ligands mpl adjuvant and ribi.529. *Expert Rev Vaccines*. 2003; 2: 219-29.
- [30] Datta SK, Cho HJ, Takabayashi K, Horner AA, Raz E. Antigen-immunostimulatory oligonucleotide conjugates: Mechanisms and applications. *Immunol Rev*. 2004; 199: 217-26.
- [31] Chang YC, Madkan V, Cook-Norris R, Sra K, Tyring S. Current and potential uses of imiquimod. *South Med J*. 2005; 98: 914-20.
- [32] Boberg A, Brave A, Johansson S, Wahren B, Hinkula J, Rollman E. Murine models for hiv vaccination and challenge. *Expert Rev Vaccines*. 2008; 7: 117-30.
- [33] Rhee JW, Kim D, Park BK, Kwon S, Cho S, Lee I, Park MS, Seo JN, Kim YS, Choi HS, Lee Y, Kwon HJ. Immunization with a hemagglutinin-derived synthetic peptide formulated with a cpg-DNA-liposome complex induced protection against lethal influenza virus infection in mice. *PLoS One*. 2012; 7: e48750.
- [34] Zhu Q, Egelston C, Vivekanandhan A, Uematsu S, Akira S, Klinman DM, Belyakov IM, Berzofsky JA. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce t cell responses: Implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 2008; 105: 16260-5.
- [35] Neves PC, Matos DC, Marcovitz R, Galler R. Tlr expression and nk cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009; 27: 5543-9.
- [36] Krieg AM. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 471-84.
- [37] Petrizzo A, Tornesello M, Buonaguro FM, Buonaguro L. Immunogenomics approaches for vaccine evaluation. *Journal of immunotoxicology*. 2012; 9: 236-40.