

Título: Avances en la comprensión de los mecanismos de toxicidad de adyuvantes vacunales y nuevas estrategias de evaluación para vacunas más seguras

Autor : Dr. Alexander Batista Duharte (alexander.batista@medired.scu.sld.cu)

Coautores: Dra Miriam Lastre González, MSc. Beatriz Tamargo Santos, DrC. Juan Francisco Infante Bouzac, DrC. Gustavo Sierra González, DrC. Oliver Pérez Martín

Centro de procedencia: Centro de Toxicología y Biomedicina. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba , Instituto Finlay. Ciudad Habana e Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Ciudad Habana

Premio en la instancia Provincial Concurso Premio Anual de la Salud 2012

Resumen

La búsqueda y desarrollo de adyuvantes vacunales (moléculas, compuestos o complejos macromoleculares que garantizan la potencia, calidad y duración de la respuesta inmune específica a los antígenos) eficientes y seguros constituye una línea de investigación prioritaria en el campo de las vacunas en Cuba y a nivel internacional. Desde 1926 el hidróxido de aluminio como adyuvante se ha utilizado para vacunas humanas y sólo en los últimos 10 años se han registrado muy escasos productos adyuvantes y a pesar de la enorme cantidad de candidatos propuestos, la toxicidad es el factor que ha impedido su introducción en la clínica. Las nuevas generaciones de vacunas necesitan de nuevos adyuvantes eficientes, sin embargo, aunque se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos de adyuvancia, poco se ha escrito sobre los mecanismos de toxicidad de los adyuvantes vacunales, lo cual limita el desarrollo de nuevas vacunas. Este conocimiento es esencial para desarrollar mejores estrategias de evaluación que repercutirá de manera positiva en el logro de vacunas más eficaces y seguras. En este trabajo se actualizan los mecanismos de toxicidad de estos productos y se propone una clasificación más acorde con los mecanismos de toxicidad. De igual modo se proponen algunas estrategias de evaluación que han desarrollado los autores que podrán ser de utilidad para una mejor evaluación de seguridad de las vacunas.

Palabras claves: adyuvantes vacunales

Introducción

Las vacunas constituyen uno de los logros más importantes en la historia de la medicina, por el impacto en la prevención de enfermedades infecciosas (vacunas profilácticas), así como en el tratamiento (vacunas terapéuticas) de enfermedades crónicas, como el cáncer, las alergias y las enfermedades autoinmunes. Al principio las vacunas estaban formadas por microorganismos vivos atenuados o completos muertos conteniendo los antígenos protectogénicos y sus adyuvantes. Sin embargo, las nuevas generaciones de vacunas se basan en antígenos cada vez más purificados, como péptidos sintéticos o recombinantes. Estos son más específicos; pero menos inmunogénicos requiriendo de componentes denominados adyuvantes, que garantizan la potencia, calidad y longevidad (memoria) de la respuesta inmune específica a los antígenos.

La búsqueda de adyuvantes ha sido generalmente empírica y por razones de toxicidad muy pocos han sido licenciados para uso en vacunas humanas. Hoy se impone un diseño racional de los nuevos candidatos a adyuvantes vacunales, debido a una mayor comprensión de los mecanismos de inducción de la respuesta inmune que incluye la

conexión entre la inmunidad innata y la adquirida, así como la necesidad de reducir al máximo los posibles efectos adversos que puedan surgir. Los adyuvantes son hoy el principal obstáculo a vencer para avanzar hacia una nueva generación de vacunas que resuelva el problema de las enfermedades que aún carecen de vacunas efectivas y además pueda mejorar algunas de las vacunas clásicas que más lo requieran.

Adyuvantes vacunales. Concepto y usos

Los adyuvantes (*del latín: el adjuvare, ayudar*) son sustancias de estructura química muy diversa, usadas para reforzar la respuesta inmune contra un antígeno administrado simultáneamente. Estos compuestos normalmente se utilizan con varios propósitos: 1) formando parte de formulaciones de vacunas humanas o veterinarias, con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune y memoria inmunológica suficiente para proteger contra un organismo infeccioso, o alcanzar una vacuna terapéutica antialérgica o antitumoral; b) para la producción de anticuerpos poli y monoclonales para diferentes usos, c) como herramientas para estudiar la respuesta inflamatoria u obtener biomodelos de autoinmunidad o d) en ensayos toxicológicos para evaluar potencial de desarrollo de hipersensibilidad .

Clasificación y mecanismos generales de acción

Los adyuvantes inmunológicos pueden ser clasificados atendiendo a su origen, mecanismos de acción y propiedades físicoquímicas. Sin embargo la clasificación más reciente y funcional fue propuesta por Schijns, categorizando estas moléculas como: 1) facilitadores de la señal 1 (entrega de antígenos) 2) facilitadores de la señal 2 (coestimulación) y 3) facilitadores de la señal 3 (polarización hacia Th1/Th2). Más tarde O'Hagan y Valiante dividieron los adyuvantes en 1) Immunopotenciadores (IP) y 2) Sistemas de liberación (SL). A esta última clasificación Pérez y col le incorporan los inmunopolarizantes (IPz) correspondiendo a aquellos productos que dirigen la respuesta inmune en una dirección requerida para la protección, la cual se corresponde con la señal 3 en la clasificación de Schijns.

Tabla 1. Adyuvantes en vacunas actualmente licenciadas para uso en humanos

	Adyuvante	IE	SL	IP	Vacuna	Productor
1	Al(OH) ₃	If I	X	Th2	Varias	
2	Al ₄ (OHPO ₄) ₃	If I	X	Th2	Varias	
3	AlOHPO ₄ SO ₄	IPV	X	?	Gardasil™	Merck
4	Ca ₃ (PO ₄) ₂	DT	X	Th2	?	?
5	MF59	I Influenza	O/W	Th2	Afluov™ (H5N3) Focetria™ (H5N1)	Novartis
6	MPL	MPL	-	Th1	Allergy	Allergy Therapeutics
7	ASO3	I Influenza	O/W	?	Prepandrix™ (H5N1)	GSK
8	ASO4	MPL	Alum	Th1	Cervarix™	GSK

VLP						
9	RC529	MPL synthetic	Alum	Th1	Supervax™	Berna Biotech
10	Virosome (VLP, IRIV)	IHA	Lipid	Th1	Epaxal™	Berna Biotech
11	Virosome (VLP, IRIV) AFPL1	I Influenza LPS (inserted), Porins, bacterial DNA	Lipid Lipid	Th1 Th1 CTL	Inflexal™ V VA-MENGOC-BC™	Berna Biotech Finlay

Abreviaturas: SL, sistema de liberación; IE: inmunoestimulador IP: inmunopolarizador; GSK, Glaxo Smith Kline; VLP, partículas semejantes a virus (del inglés virus like particles); D.P.T, se refiere a antígenos de difteria, pertussis y tétanos combinados o formulados por separado; HxNx, antígenos de virus de Influenza; VHB, antígenos de virus de hepatitis B; VPI, virus de polio intramuscular; HiB, antígenos de Haemofilus influenzae B ; VHA, antígenos del virus de hepatitis A; VPH, virus del papiloma humano; CTB, subunidad B de toxina de cólera, es el único adyuvante mucosal aprobado como parte de la vacuna de cólera inactivada

Toxicidad de los adyuvantes

Generalmente se acepta que la adyuvancia y la toxicidad deben ser balanceadas para obtener un máximo de estimulación con un mínimo de efectos adversos. Si el objetivo es una vacuna veterinaria, para la producción de anticuerpos poli o monoclonales, o incluso para vacunas humanas terapéuticas antitumorales, algún nivel de efecto adverso pudiera ser aceptable lo cual sería injustificable cuando se trata de vacunas preventivas en humanos.

Efectos adversos inducidos por adyuvantes vacunales

La hiperactivación del sistema inmune por adyuvantes puede asociarse a reacciones que involucran varios mecanismos inmunológicos, aunque el perfil general de efectos adversos puede involucrar reacciones que no tienen relación con el sistema inmune como tal. Las reacciones adversas de los adyuvantes pueden clasificarse en locales y sistémicas.

Reacciones adversas locales: La mayoría de los adyuvantes producen algún tipo de efectos en el sitio de la inoculación. La inflamación suele ser la más frecuente reacción pudiendo ser transitoria y con síntomas leves, o más duradera e intensa, pudiendo oscilar desde el dolor local y eritema hasta la formación de granulomas, quistes, abscesos, úlceras y necrosis como ocurre con el Adyuvante Completo de Freund, particularmente si las dosis y frecuencia de administración son mayores que las recomendadas.

Muchas de las reacciones locales como las úlceras y necrosis producidas por emulsiones de aceite mineral, no son de naturaleza inmune, pudiendo ser debido a la irritación primaria por la presencia de hidrocarburos de cadenas cortas en la preparación. Estos hidrocarburos producen un efecto detergente disolviendo la bicapa lipídica de la membrana celular causando lisis celular. El Mannide monooleate, usado a menudo en las emulsiones w/o como un agente emulsionante, puede metabolizarse a ácidos grasos tóxicos que

causan reacciones locales. También se han descrito interacciones con la membrana celular que conllevan a citólisis como es el caso de las saponinas derivadas de *Quijalla saponaria*. y sus fracciones purificadas.

La hipersensibilidad retardada se produce por la migración de células inmunocompetentes al sitio de inoculación, incluyendo linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, macrófagos y otras células secretoras de citoquinas como IL-1, IL-2, factor estimulante de colonias, quimocinas, y otros mediadores causando reclutamiento celular, edema, proliferación de fibroblastos entre otras. Si la formulación adyuvante contiene partículas no degradables es posible observar granulomas con macrófagos activados, linfocitos, fibroblastos y otras células como ocurre después del uso de adyuvantes de Freund e hidróxido de aluminio y otras partículas de difícil biodegradación.

La reacción de Arthus, se ha visto eventualmente asociada a las reacciones locales de los adyuvantes y vacunas. Esta reacción se caracteriza por la formación de complejos inmunes inflamatorios en el sitio de inoculación entre los antígenos vacunales o el adyuvante y anticuerpos preexistentes o componentes del complemento. Este es un fenómeno asociado con altos títulos de anticuerpos inducidos por el adyuvante, el cual puede ser erróneamente confundido con una reacción de hipersensibilidad retardada.

Efectos tóxicos sistémicos: Son una consecuencia de la hiperactivación de mecanismos inmunológicos inducidos por la formulación adyuvante y son con frecuencia mediados por la liberación de citoquinas, ya que los mecanismos biológicos que ellos modulan son muy poderosos.

Respuesta de fase aguda: La inestimulación farmacológica puede conllevar a una serie de reacciones conocidas colectivamente como respuesta de fase aguda (RFA). Esta respuesta describe un síndrome transitorio caracterizado por cambios reversibles en las proteínas plasmáticas acompañadas de fiebre, leucocitosis y cambios en el metabolismo y función de diversos órganos que conforman un síndrome denominado "pseudogripal" mediado por varias citoquinas y otros factores humorales. Esta reacción que incluye fiebre, cefalea, artralgia, mialgia, escalofríos y malestar general.usualmente aparece en las primeras horas después de la vacunación y el paciente se recupera en unas pocas horas. La RFA es iniciada cuando el TNF- α , IL-1 y la IL-6, denominadas citoquinas pro-inflamatorias, alcanzan niveles suficientes capaces de modificar funciones fisiológicas distantes del sitio inductor. La acción primaria de la RFA involucra el hígado, el sistema hematopoyético y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Los hepatocitos responden a estas citoquinas primariamente a través de la alteración de la transcripción de genes que codifican determinadas proteínas llamadas proteínas de fase aguda. Varias proteínas hepáticas se elevan en el suero: complemento (C2, C3, C4, C5, C9, C1inhibidor, C4-binding protein; Mannose-binding lectin [MBL], Factor B, Coagulation/fibrinolysis factors (fibrinogen, plasminogen, protein S, von Willebrand Factor. [VWF], plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1], tissue plasminogen activator [TPA]), C-reactive protein [CRP]; and serum amyloid A [SAA]. Algunas de ellas son utilizadas como biomarcadores de RFA.

Síndrome de escape vascular: Es una reacción adversa seria observada tras la administración de IL-2 y otras citoquinas. Se caracteriza por un incremento de la permeabilidad vascular acompañada de extravasación de fluidos y proteínas resultando en edema intersticial y fallo orgánico. Las consecuencias clínicas de estos cambios se

caracterizan por un síndrome caracterizado por hipotensión arterial, aumento de peso, congestión pulmonar, anasarca en casos severos y fallo cardiovascular.

La patogénesis del daño endotelial es complejo y pobremente comprendido y puede involucrar la activación o el daño de las células endoteliales y leucocitos, la liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios como IL-1, TNF- α , componentes del complemento, alteración en la interacción célula- célula con el tejido conectivo, así como perturbaciones en la integridad vascular. Este síndrome constituye una seria limitante para el uso de citoquinas como adyuvantes vacunales.

Inducción o agravamiento de enfermedades autoinmunes: Existen evidencias experimentales de que un antígeno propio administrado con un adyuvante puede generar, en biomodelos animales sensibles, una enfermedad autoinmune, incluso pequeños péptidos que tienen alguna similitud secuencial con estructuras propias, bajo determinadas condiciones experimentales, pueden inducir estos efectos. También existen reportes de pacientes que han desarrollado enfermedades autoinmunes después de aplicadas determinadas vacunas sospechándose una relación causal, aunque los estudios epidemiológicos no han confirmado esta asociación, lo cual ha generado mucho debate en este tema. En línea con este debate, recientemente se describió un síndrome denominado *Síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvantes o Síndrome de Shoenfeld*, el cual necesita aun ser validado por la comunidad científica.

El desarrollo de un proceso autoinmune descansa en la influencia de factores genéticos asociados a factores externos. En relación con el factor genético, es indudable que no todos los individuos tienen la misma predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmune. Existen reportes de asociación de ciertos haplotipos HLA con enfermedades autoinmunes por ejemplo el HLA-B27 con enfermedades como la espondilitis anquilosante.

Otros genes asociados al desarrollo de enfermedades autoinmunes, han sido descritos en la última década. El gen AIRE (del inglés: *autoimmune regulator*), participa en la presentación de autoantígenos durante el proceso de tolerancia central en el timo para la deleción de linfocitos T autoreactivos, cuyo defecto puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes multisistémicas, asociadas a trastornos en el funcionamiento de linfocitos con función supresora del fenotipo CD4⁺ FoxP3 o células Treg. También hay asociaciones con polimorfismos en el gen que codifica el CTLA-4 (del inglés: *cytolytic T lymphocyte-associated antigen*), un regulador negativo en la activación de linfocitos T, y en la familia de proteínas TIM (del inglés: *T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing*).

La existencia de mimetismo en antígenos microbianos, constituyen mecanismos de evasión de la respuesta inmune que propician al fracaso de algunas vacunas, pero pueden también constituir un peligro potencial para el desarrollo de autoinmunidad postvacunal. Afortunadamente los mecanismos de tolerancia son muy efectivos para limitar el efecto nocivo que pudiera causar el mimetismo molecular entre microorganismos y estructuras propias.

Si se analiza el otro componente de la formulación vacunal: el adyuvante, utilizado para mejorar la potencia de la respuesta inmune contra el antígeno coadministrado, puede deducirse que un linfocito T autoreactivo, que en condiciones fisiológicas no reconoce antígenos propios por estar bajo la presión de la tolerancia periférica, bien pudiera

incrementar su capacidad de reconocimiento y activación por la influencia de la actividad del adyuvante y desarrollar una respuesta significativa Th1 autoreactiva.

Estos resultados evidencian que la presencia del adyuvante puede propiciar, bajo ciertas condiciones, una enfermedad autoinmune post vacunal en un individuo genéticamente susceptible, por lo que puede ocurrir que en poblaciones de individuos sanos, existan células pre-Th1 potencialmente reactivas frente a numerosas estructuras proteicas propias expresadas en los tejidos, pudiendo ser diferenciadas a células de memoria del fenotipo Th1 luego de subsiguientes infecciones o vacunaciones conteniendo péptidos o proteínas miméticas.

Alergia: El desarrollo de reacción alérgica por los adyuvantes es un tema controversial. El hidróxido de aluminio produce estimulación de IgE y eosinofilia y esto ha sido una preocupación en el posible desarrollo de una reacción alérgica, aunque a pesar del amplio uso de este adyuvante durante muchas décadas ha sido difícil demostrar reacciones alérgicas mediadas por IgE antígeno-específicas asociadas al uso de este adyuvante. Contrariamente, algunos adyuvantes Th1 pueden prevenir reacciones alérgicas y consecuentemente estos han sido evaluados para su uso en vacunas contra estas enfermedades.

Modificación del metabolismo hepático: La biotransformación de drogas por las enzimas del sistema citocromo P 450 (CYP) se inhibe por la acción de una respuesta inflamatoria y por la administración de Bacillus Calmette Guerin (BCG) y otras vacunas. Renton y colaboradores reportaron problemas con la eliminación hepática de teofilina después de la aplicación de una vacuna contra la influenza como una evidencia de este efecto. En otros trabajos ellos demostraron que la liberación de citoquinas como IL-1, IL-2, IL-6, TNF, TGF- β e IFNs, están involucradas en importantes modulaciones de la expresión de muchas isoformas de CYP. También se ha reportado un rápido decrecimiento en el contenido total de P450 en hígado de ratas tratadas con FCA y la disminución selectiva de isoformas específicas de CYP, demostrado por disminución de los niveles de mRNA (CYP2B, CYP2C11, CYP3A1, y CYP2E1), contenido proteico (CYP2B, CYP2C11, y CYP2E1) o actividad catalítica (CYP2C6, CYP2C11, y CYP2E1). Estas modificaciones bioquímicas y metabólicas pueden tener consecuencias farmacocinéticas y farmacodinámicas cuando las drogas que son aclaradas en el hígado, son administradas en conjunto con FCA y otros potentes inmunoestimuladores y vacunas.

Inmunotoxicidad embrio fetal: Los adyuvantes pueden potencialmente tener algunos efectos en el desarrollo embriofetal. El balance de la respuesta Th1/Th2 influye en este desarrollo ya que la respuesta inmune materna tiene un perfil preferencial Th2 y una disminución del perfil Th1. Un perfil Th1 durante el embarazo puede incrementar el riesgo de defectos morfológicos fetales. Por ejemplo, la inyección de altas dosis de CpG ODN, un adyuvante inductor de respuestas Th1, en ratones C57BL/6 gestantes, resultó en un marcado incremento de la resorción fetal y defectos craneofaciales, mientras que bajas dosis evidenciaron muy pocos efectos. De este modo una vacuna o adyuvante capaz de alterar intensamente el perfil hacia Th1 pudiera en teoría tener consecuencias perjudiciales en el desarrollo embriofetal. Existe muy poca información disponible en relación con los efectos y mecanismos posibles de estos tipos de reacciones, por lo que se requiere mayores estudios sobre la alteración del sistema inmune de vacunas y adyuvantes en gestantes, asunto que requiere especial atención por el incremento de la aplicación de vacunas en mujeres en edad fértil.

Experiencias en el proceso de evaluación y aprobación de nuevos adyuvantes en Cuba

El amplio y vertiginoso desarrollo de los adyuvantes lleva aparejado consigo una mayor complejidad en los estudios que se realicen. El CECMED, siguiendo las recomendaciones surgidas de la interacción entre las las agencias regulatorias nternacionales y fabricantes, establece los siguientes aspectos para el registro sanitario de adyuvantes vacunales:

A) Información farmacéutica/biológica: Caracterización del adyuvante: Estructura, tamaño de partícula y distribución, composición cualitativa y cuantitativa, carga superficial (adyuvantes tensoactivos), pH, agentes residuales de la fabricación ej: reactivos, ácidos nucleicos, agentes adventicios para adyuvantes obtenidos por técnicas recombinantes, pureza e identidad, esterilidad, determinación de endotoxinas. Materiales de partida y proceso de fabricación. Con la demostración de la compatibilidad del adyuvante con los componentes antigénicos presentes en la vacuna a administrar. Grado de adsorción con la demostración de la adsorción eficiente de todos los componentes antigénicos presentes en la vacuna y como parte de los ensayos de consistencia. Interferencia del adyuvante sobre la capacidad de los ensayos de los componentes. Estabilidad (según las propiedades físico-bioquímicas principales), considerando el adyuvante sólo y la estabilidad de cada componente en la formulación final.

B) Información preclínica sobre el adyuvante: Los estudios preclínicos tendrán dentro de sus objetivos: i) La evaluación del perfil de toxicidad que pueda tener el adyuvante de forma independiente, es decir, fuera de la formulación, ii) Demostrar su efecto sobre la respuesta inmune mediante la evaluación de la vacuna con y sin adyuvante, en modelos animales apropiados, si existen, iii) Evaluar la relación antígeno - adyuvante seleccionada, iv) Análisis donde se demuestre que la relación antígeno/ adyuvante no provocan un sinergismo de eventos adversos en el modelo animal comparado con los componentes individuales.

Además de los estudios de toxicidad general; los estudios preclínicos de inmunotoxicidad del adyuvante deberán ser incluidos y estos incluirán: la tolerancia local con observación de reacción en el sitio de inyección, inducción de hipersensibilidad y anafilaxis, pirogenicidad, toxicidad sistémica en tejidos y órganos, toxicidad reproductiva, carcinogénesis cuando la estructura química o la de sus metabolitos o su mecanismo de acción tenga semejanza con productos conocidos como cancerígenos, genotoxicidad (mutagenicidad) en los casos de adyuvantes de ADN. Los estudios farmacocinéticos se recomiendan para los nuevos adyuvantes y cuando se pretende usar otras vías alternativas de administración ej: Oral o intranasal.

C) Ensayos clínicos: Los ensayos clínicos deben estar dirigidos a demostrar las ventajas clínicas del uso del adyuvante así como la compatibilidad del mismo con los demás componentes de la vacuna en términos de eficacia y/o inmunogenicidad.

Nuevas estrategias para la evaluación preclínica de adyuvantes vacunales

Mapeo de epítopes por bioinformática: La existencia de bases de datos de genoma y proteoma humano y de otras especies que además ofrecen informaciones adicionales

como estructura, función, estructuras compartidas u otras, constituye hoy una herramienta de gran utilidad para el diseño de vacunas y para la predicción de toxicidad.

Estudios in vitro: Estos ensayos siempre son aceptados debido a su bajo costo, a que sustituyen animales de laboratorio, cumpliendo el principio de las 3R, entre otras ventajas. Estos ensayos se han empleado tanto para la determinación de ciertos mecanismos farmacológicos, estimulación linfocítica, y estudios de inmunotoxicidad, pero también para estudios de irritación de adyuvantes como por ejemplo los ensayos de hemólisis y de citotoxicidad directa. Estos métodos deben tener en un futuro un mayor espacio en los estudios de toxicidad.

Uso de modelos animales especiales: Teniendo en cuenta que muchas reacciones de toxicidad se desarrollan en individuos genéticamente sensibles, se ha intentado emplear modelos de animales sensibles a desarrollar autoinmunidad como por ejemplo: el ratón (NZB/NZW) F1, el ratón NOD (non - obese diabetic), o las ratas Brown Norway o BB (bio – breeding), los cuales desarrollan espontáneamente procesos autoinmunes, sin embargo, estudios utilizando estos modelos para ensayos de toxicidad de vacunas han sido muy limitados y no están validados, por lo que la información que su uso puede ofrecer para la predicción de toxicidad en humanos es limitada.

Conclusiones

Después de más de 80 años de estancamiento en el uso casi exclusivo de adyuvantes derivados de sales del aluminio, para vacunas humanas y de la prevalencia del empirismo como método de trabajo para obtener formulaciones vacunales “adyuvadas”; se han introducido algunos nuevos adyuvantes con un diseño más racional pero aún son muy pocos los que han pasado la barrera del Registro Médico, ya que las exigencias regulatorias han aumentado, para la demostración de eficacia y seguridad de las formulaciones conteniendo nuevos adyuvantes. A pesar de esto existe un gran número de nuevos candidatos a adyuvantes más definidos que esperan pasar a ensayos clínicos. Cuba puede exhibir significativos resultados con novedosas formulaciones adyuvantes, algunas de ellas incluso patentadas, y muy avanzadas en su desarrollo tecnológico y clínico. Sin embargo la aplicación de los nuevos conocimientos que aplican los mecanismos de adyuvancia y toxicidad son imprescindibles para obtener mejores resultados en eficacia y seguridad. Este trabajo es una pequeña contribución en ese empeño.

Referencias bibliográficas seleccionadas

1. **Aguilar JC, Rodríguez EG.** Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007; 25: 3752–3762.
2. **Anderson AC, Anderson DE.** TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006, 18:665–669.
3. **Balls M.** Animal experimentation and the three Rs: past, present and future. *ATLA* 2009; 37, suppl2: 1-6.
4. **Baluna, R** Cytokine-Induced Vascular Leak Síndrome. In: House RV and Descotes J ed 2007 *Cytokines in Human Health: Immunotoxicology, Pathology and Therapeutic Applications.* Humana Press.
5. **Batista-Duharte A, Murillo G, Pérez U, Tur E, Portuondo D, Pérez O.** Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCo1 por el método de HET-CAM. *VacciMonitor* 2011; 20(1):22-27.

6. **Batista-Duarte A, Portuondo DF, Betancourt J, Urdaneta L.** Adjuvant effect and toxicity profile of a particulate natural product. *Vaccine* 2006;24S2 (S2/96–52/102).
7. **Batista-Duarte A, Quattrocchi V, Olivera C, Langellotti JS, Pappalardo S, Di Giacomo C, et al.** Adjuvant effect of Cliptox™ on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. *Vaccine* 2010; 28: 6361- 6366.
8. **Batista-Duarte A, Tamargo B** ✨, **Téllez B, Fleitas C., Infante J F. Portuondo D,** Molecular mimicry between PorB protein from *Neisseria meningitidis* B and self-proteins is insufficient condition for triggering early post-vaccination autoimmunity in mice. *Revista Cubana de Toxicología* 2012 (Enviada).
9. **Batista-Duarte A.** Aplicación intranasal de vacunas. Estado actual y perspectivas. *Rev. Mex Patol Clin* 2003 50(4): 199-208.
10. **Batista-Duarte A., Murillo G., Pérez U., Tur E., Betancourt J., Portuondo D.** The hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM), a useful in vitro assay for assessing irritation properties of immunoadjuvants formulations. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* (Enviada).
11. **Batista-Duarte, A., Lindblad, E., Oviedo, E.** Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol. Lett.* 2011;203: 97–105.
12. **Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Pérez O, Petrovsky N.** AFCo1, a meningococcal B-derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 and 5. *Malaria Journal* 2009, 8:35.
13. **Brennan, F., Dougan G.** Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* 2005., 23: 3210–3222.
14. **Calabro S, Tortoli M, Baudner B, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan D, et al,** Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 2011; 29 1812–1823.
15. **Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Bisset G, García L, Puentes G, et al..** Método para la obtención de una vacuna de amplio espectro protector contra *Neisseria meningitidis* del serogrupo B y la vacuna resultante. Patente Cubana CU 21888 A1; 1989.
16. **Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Bisset G, García L, Puentes G, Sampedro MC, et al.** Method for obtaining a vaccine with wide protective range against group B *Neisseria meningitidis*, the resulting vaccine, gamma globulin and transferfactor. *European Patent EP 0301992; 1995.*
17. **Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, et al.** Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. *US Patent 5, 597,572.* 1997 Jan. 28.
18. **Cuello M, Cabrera O, Thörn K, Lindqvist M, Persson J, Lastre M, et al.** AFCo1 como adyuvante mucosal para enfermedades de transmisión sexual. *VacciMonitor* 2011; 20 (Suppl. 1): 7.
19. **Descotes J.** Methods of evaluating immunotoxicity *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2006; 2(2), 249259.
20. **Domínguez A, Tamayo M, Pérez IY, Salas H, Pérez O, Batista-Duarte A.** Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor* 2009; 18 (3): 13-17.
21. **Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA.** Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008; 453: 1122-1126.

22. EMEA (European Medicines Agency) 2005. Committee for Medicinal Products for Human Use Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use. EMEA/CHMP/VEG/134716/2004.
23. **Freund J, Casals J, Hosmer EP.** Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;37:509–13.
24. **Fujinami, R.S., Oldstone, M.B.,** Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science (New York, NY)* 230, 1985; 1043-1045.
25. **Garçon N., Segal, L., Tavares, F., Van Mechelen, M** The safety evaluation of adjuvants during vaccine development The AS04 experience. *Vaccine* 2011;.29: 4453–4459.
26. **Glenny A, Pope C, Waddintong H, Wallace U.** The antigenic Value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 1926; 29:31-40.
27. **Gribble, E.J., Sivakumar, P.V., Ponce, R.A., Hughes, S.D.,** Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2007; 3, 209-234.
28. **Guillén G, Aguilar JC, Dueñas S, Hermida L, Guzmán MG, Penton E, et al.** Virus-Like Particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Ninth Global Vaccine Research Forum and Parallel Satellite Symposia, Bamako, Mali, 6-9 December 2009. *Proceed in Vaccinology* 2010; 2: 128-133.
29. **Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., Gupta, C.K.,** Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 1993;.11, 293-306.
30. **Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, Zayas C et al .** Ensayo de inmunogénicidad y de toxicidad local del cocleato de Neisseria meningitidis en ratas Spregue Dawley. *VacciMonitor* 2009; 18(1):1-7.
31. **Ioannou, X., Gomis, S., Karvonen, B, Hecker, R, Babiuk L, van Drunen L., van den Hurk, S.,** CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein *Vaccine* 2002, 21,127–137.
32. **Kawai T, Akira S.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like Receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 373-385
33. **Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al.** Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008; 205: 869-882.
34. **Lach, B., Cupler, E.J.,** Macrophagic myofasciitis in children is a localized reaction to vaccination. *Journal of Child Neurology* 2008; 23(6):614-9.
35. **Lastre M, Perez O, Labrada A, Bidot I, Perez J, Bracho G, et al.** Bacterial derived proteoliposome for allergy vaccines. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 2): S2-S5.
36. **Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F.** Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008; 181: 17-21.
37. **Lo H, Tang CM, Exley RM** Mechanisms of avoidance of host immunity by Neisseria meningitidis and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis.* 2009;.9(7):418-27.
38. **Luzardo M del C, Calderón L, Martínez Y, Labrada A, Facenda E, Álvarez CM, et al.** Lípidos liposomales como inmunoadyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y de los alérgenos principales del ácaro Dermatophagoides siboney. *Biotecnología Aplicada* 2006; 23(4):330-336.

39. **Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira Sh, Ishii K, Bureau F, Desmet C.** DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine*, 2011; 17 (8): 996-1002.
40. **Marrack P, McKee A, Munks M.** Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(4): 287–293.
41. **Matzinger, P.,.** Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 1994; 12, 991-1045.
42. **Megan KL, MacLeod A, McKee S, Alexandria D, Wang J, Mason R, et al.** Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *PNAS*; May 10, 2011; 108 (19): 7915..
43. **Meroni P.** Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): Old truths and a new syndrome?. *J Autoimmun* 2011;36:1-3.
44. **Mogensen TH.** Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 240-273.
45. **Mora D, Domínguez R, Duque E, Martínez L, Escoto J, Jacobo O.** Adjuvants: Present regulatory challenges. *Vaccine* 2006; 24S2 S2/88–S2/89.
46. **Mora D, Domínguez R, Duque E, Martínez L, Escoto J, Jacobo O.** Adyuvantes: Un desafío en el ámbito regulatorio. *Info Cecmed* 2007; 12(55): 3-9.
47. **Noe S., Green M., HogenEsch H., Hem S.** Mechanism of immunopotentiality by aluminum-containing adjuvants elucidated by the relationship between antigen retention at the inoculation site and the immune response. *Vaccine* 28 (2010) 3588–3594.
48. **O'Hagan DT, Valiante NM.** Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 727-735.
49. **Orbach H, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G.** Vaccines and autoimmune diseases of the adult. *Discov Med.* 2010; (45):90-7.
50. **Pérez O, Batista-Duharte A, Elizabeth González, Caridad Zayas, Julio Balboa, Maribel Cuello, et al.** Human prophylactic vaccine adjuvants and their essential role in new vaccine formulations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2012) 45: (En prensa).
51. **Pérez O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, González D, et al.** Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine xxx* (2005) xxx–xxx
52. **Perez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al.** Natural Neisseria derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 762-764.
53. **Pérez O, Lastre M, Bracho G, Del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al.** Natural neisseria derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *Pharmacology online* 2006; 3:762-764.
54. **Pérez O, Lastre M, Bracho G, Del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al.** Bacterial derived proteoliposome for allergy vaccines. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl. 2):34.
55. **Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Bracho G, Díaz M, Zayas C, et al.** Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection of Cuban anti-meningococcal BC vaccine. *Infect Immun* 2001; 69:4502–8.
56. **Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., Tschopp, J.,.** The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19, 615–622.
57. **Petrovsky N.** Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma *Expert Rev. Vaccines* 2008; 7(1), 7–10.

58. **Prater, M.R., Johnson, V.J., Germolec, D.R., Luster, M.I., Holladay, S.D.,** Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice. *Vaccine* 2006; 24, 263-271.
59. **Projean D, Lessard E, Ducharme P, Ducharme J.** Use of Freund's Complete Adjuvant (FCA) in inflammatory pain models: Consequences on the metabolism and pharmacokinetics of the non-peptidic delta receptor agonist SNC80 in the rat. *Xenobiotica*, August 2007; 37(8): 870–88
60. **Ramon G.** Procèdes pour accroître la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1926; 40:1-10.
61. **Renton K.W.** Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicology* 2000; 142:229-37..
62. **Rodríguez T, Pérez O, Menager N, Ugrinovic S, Bracho G, Mastroeni P.** Interactions of proteoliposomes from serogroup B *Neisseria meningitidis* with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery. *Vaccine* 2005; 23:1312–13.
63. **Rose NR.** Autoimmunity, infections and adjuvants. *Lupus* 2010; 19(4): 354-358.
64. **Ryan KR., Patel SD., Stephens LA., Anderton SM.** Death, adaptation and regulation: The three pillars of immune tolerance restrict the risk of autoimmune disease caused by molecular mimicry. *J Autoimmun* 2007 (29): 262-271.
65. **Saint-Remy JM.** Epitope mapping: a new method for biological evaluation and immunotoxicology *Toxicology* 1997; 119: 77-81.
66. **Schijns, V.E.** Unraveling “the immunologists dirty little secret”. In: Schijns, V.E., O'Hagan, D.T. (Eds.), *Immunopotentiators in Modern Vaccines.* , 1st ed Elsevier Academic Press, USA, ., 2006. pp. 1–16.
67. **Shoenfeld Y, Agmon-Levin N.** “ASIA”- Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2011;36:4-8.
68. **Sierra González G, Tamargo Santos B.** Adyuvantes inmunológicos para vacunas humanas: estado actual, tendencias mundiales y en Cuba. *Ann Acad.* 2011 (1)2: 1-32.
69. **Sierra VG, Campa HC, Valcárcel NM, García IL, Izquierdo PL, et al.** Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Annals.* 1991; 14:195-210.
70. **Slutter B, Hagens N, Jiskoot W., 2008.** Rational design of nasal vaccines. *J Drug Target* 16: 1–17.
71. **Tamargo B, Fleitas C, Infante JF, Márquez Y, Ramírez W, et al.** Evaluación inmunotoxicológica de nuevas formulaciones adyuvantes nanoparticulados sin Al(OH)₃ ensayadas como candidatos vacunales contra *Neisseria meningitidis*. *VacciMonitor* 2011; 20 (Suppl.1): 9.
72. **Tamargo B, Ramírez W, Márquez Y, Labrada A, Fresno M, Sierra VG.** New proteoliposomic formulation from *N. meningitidis* serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antimeningococcal protectogenic potencial as well as Th1 adjuvant capacity. *BMC J Immunol* 2011; (Accepted).
73. **Tamargo B, Ramírez W, Márquez Y, Labrada A, Fresno M, Sierra VG.** New proteoliposomic formulation from *N. meningitidis* serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antimeningococcal protectogenic potencial as well as Th1 adjuvant capacity. *BMC J Immunol* 2011; (Accepted).