

Título: Métodos alternativos para la evaluación inmunotoxicológica de adyuvantes vacunales.

Autores: DrC. Alexander Batista Duharte^{1*} (alexander.batista@medired.scu.sld.cu); DrC. Oliver Pérez Martín²; DrC. Gustavo Sierra González² MSc. Deivys Portuondo Fuentes¹ Lic. Onel Fong Lores¹, Dr. Ulpiano Pérez Marqués¹. Dra Gisela Murillo Jorge¹. Lic. José Carlos Rodríguez Tito¹. Dr. Edgar Puente Zapata¹; Tec. Mereidis Colón Suárez¹; DrC. Juan Francisco Infante Bouzac². Dra. Miriam Lastre González

Centros de procedencia: ¹ Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Universidad de Ciencias Médicas. Santiago de Cuba
² Instituto Finlay. La Habana

Palabras claves: vacunas, adyuvantes vacunales, inmunotoxicidad, respuesta inmune.

PREMIO EN LA INSTANCIA PROVINCIAL DEL CONCURSO, AÑO 2013
CATEGORÍA: INVESTIGACIÓN APLICADA

Introducción

Los adyuvantes son moléculas, compuestos o complejos macromoleculares que garantizan la potencia, la calidad y la longevidad (memoria) de la respuesta inmune específica, reduciendo la cantidad de antígenos o el número de dosis, mejorando la eficacia de las vacunas tanto en personas inmunocompetentes como en los recién nacidos, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos. La búsqueda de adyuvantes ha sido generalmente empírica; pero en la actualidad existe una tendencia creciente al diseño racional, 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 (Garlapati y col., 2009).

Muy pocos adyuvantes han sido aprobados para humanos incluyendo el hidróxido de aluminio desde 1926 y esto se debe fundamentalmente a sus toxicidades. Las

reacciones inmunotóxicas inducidas por adyuvantes son muy frecuentes y van desde la **irritación local** que libera señales de daño, la inducción de hipersensibilidad retardada o la reacción de Arthus, hasta reacciones sistémicas, como los síndromes pseudogripal y de escape vascular (**fenómenos autoinmunes**, la **inhibición del metabolismo de fármacos coadministrados** con incremento de sus niveles en sangre, sus toxicidades y trastornos en la morfogénesis fetal.

Por lo referido anteriormente, existe una notable resistencia de las agencias reguladoras para aceptar nuevos adyuvantes, por lo que estos deben acumular numerosos ensayos que evidencien su inocuidad. Por esta razón, existe un **problema científico** muy bien identificado y es la **urgente necesidad de desarrollar y validar nuevos modelos y métodos de evaluación preclínica para los adyuvantes en desarrollo, en concordancia con sus mecanismos de toxicidad.**

Las reacciones locales son las más frecuentes manifestaciones de toxicidad de las vacunas y los adyuvantes, por lo que deben ser profundamente evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estas reacciones pueden ser una consecuencia de la irritación local directa e inmediata del producto, como ocurre con las saponinas y muchas emulsiones, o de la acumulación de células inflamatorias por un efecto de depósito del adyuvante que contribuye a la toxicidad local.

La toxicidad local de los adyuvantes generalmente se evalúa al final de los estudios farmacológicos y toxicológicos *in vivo*, lo cual no permite detectar efectos inmediatos como la irritabilidad directa. La introducción de métodos *in vitro* para evaluar el potencial irritante directo de una formulación vacunal puede aportar información adicional importante para una mejor caracterización de la seguridad de los adyuvantes. El HET-CAM (del inglés, 'hen's egg test on chorioallantoic membrane'), es una técnica validada por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia), que la ofrece como método alternativo a la clásica prueba de Draize en conejos, para determinar el efecto irritante de diferentes sustancias y ha sido aprobada por las entidades reguladoras europeas para este fin.

Esta técnica, a diferencia de otros métodos *in vitro*, es muy simple, rápida y económica y sobre todo, permite evaluar sustancias de diferentes tipos, solubilidades y composiciones. Por esta razón y debido a la gran diversidad en la naturaleza de los adyuvantes, así como por el creciente interés de su empleo por vía mucosal, nos preguntamos **¿será útil el HET-CAM para determinar la irritabilidad local directa de adyuvantes vacunales?**

La posibilidad de que una vacuna sea capaz de inducir una reacción autoinmune postvacunal es un tema actual de gran debate. Existen reportes de sospechas de esta asociación para vacunas específicas y adyuvantes, aunque la mayoría de los estudios epidemiológicos no han podido confirmar esta asociación. El papel del mimetismo molecular (similitud estructural entre antígenos exógenos y estructuras propias) en la inducción de reacciones de autoinmunidad se ha puesto de manifiesto en diversos modelos animales, por la inmunización con un péptido mimético asociado o no a un adyuvante. De este modo, surge la hipótesis de que la autoinmunidad postvacunación es causada por el mimetismo molecular y la complementariedad antigénica en presencia de un adyuvante y en individuos con determinados HLA (*del inglés, 'Human Leucocyte Antigens'*). La bioinformática (estudios *in silico*) se utiliza para la detección del mimetismo molecular entre componentes vacunales y el proteoma humano con posibilidades, teóricamente de producir reacciones autoinmunes; de modo que la combinación de los estudios *in silico* con ensayos *in vivo* pudiera ser una herramienta valiosa como parte de los ensayos toxicológicos para la predicción de fenómenos autoinmunes postvacunales. Sin embargo, aunque teóricamente es posible esta predicción, aún no se ha establecido el verdadero valor práctico de estos estudios a nivel preclínico. Por ello, **¿será útil la determinación *in silico* del mimetismo molecular entre antígenos vacunales y propios para pronosticar la autoinmunidad postvacunal a nivel preclínico?**

La aparición de efectos tóxicos por la coadministración de medicamentos con vacunas es un tema de interés actual; pero su evaluación no está contemplada en las guías reguladoras vigentes. Se ha reportado que la aplicación de la vacuna BCG (*del inglés, 'Bacillus Calmette Guerin'*), inhibe el metabolismo de fármacos coadministrados, así como el incremento de la vida media en plasma y la toxicidad de la Teofilina luego de

la aplicación de vacunas de influenza. Paralelamente, se han realizado estudios preclínicos que muestran que en biomodelos de inflamación, así como durante infecciones, puede modificarse la biotransformación de fármacos como la Teofilina y de sustancias químicas, incrementando su toxicidad. Hoy está bien establecido que las citocinas proinflamatorias liberadas durante la inmunoestimulación, inhiben las enzimas citocromo P450 (CYP) hepática, pudiendo afectar el tiempo de vida media y la toxicidad de medicamentos que se metabolizan por esta vía como la Teofilina. Sin embargo, el efecto de la inmunoestimulación inducida por adyuvantes y su posible relación con la toxicidad de medicamentos coadministrados no ha sido suficientemente estudiado. Por ello, **¿podrá utilizarse un modelo cinético de Teofilina sérica en ratas para determinar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre medicamentos que se metabolizan por vía de las CYP?**

Según los problemas identificados, la **Hipótesis** de este trabajo fue: **Los ensayos preclínicos contemplados en las guías reguladoras vigentes no son suficientes para evaluar los efectos inmunotóxicos de los adyuvantes vacunales. La aplicación de métodos alternativos que exploren algunos mecanismos de toxicidad, contribuirá a ampliar y perfeccionar los estudios de inmunotoxicidad de los candidatos a adyuvantes vacunales.**

A partir de esta hipótesis nos propusimos los siguientes **Objetivos**:

1. Demostrar la utilidad del **HET-CAM** para determinar la **irritación local** directa de adyuvantes vacunales;
2. Evaluar la utilidad de la **determinación *in silico* del mimetismo molecular** entre antígenos vacunales y propios **para pronosticar la autoinmunidad postvacunal** a nivel preclínico.
3. Demostrar la utilidad de un **biomodelo cinético de teofilina sérica** para determinar el **efecto de la inmunoestimulación** por adyuvantes sobre la **toxicidad de fármacos** que se metabolizan a través de las CYP.

Diseño metodológico

HET-CAM para la evaluación de irritabilidad local de adyuvantes vacunales

Los productos seleccionados fueron adyuvantes conocidos (FCA, FIA, Al-gel, y Montanide IMS 1313 VG), así como los adyuvantes experimentales (Montanide IMS

1314 N VG, Cliptox y AFCo1), formulados con PBS sin antígenos para detectar la propiedad irritante intrínseca de cada producto. A estos productos se les realizó ensayo de HET-CAM para detectar irritación directa y paralelamente se realizó un estudio de tolerancia local en ratones para observar el efecto en sitio local de inoculación y de este modo comparar ambos métodos.

Los adyuvantes con efecto irritante severo o moderado en el HET-CAM produjeron reacciones severas locales en ratones, y los adyuvantes no irritantes en el HET-CAM; indujeron una ligera reacción local o no produjeron reacción local visible. Aunque hubo una correspondencia significativa ($p < 0.001$) entre ambos métodos, se pudo detectar sutiles diferencias al medirse cuantitativamente la concordancia entre ellos por los métodos de Coeficiente de Contingencia y el Coeficiente Lambda, lo cual puede ser debido a las propiedades intrínsecas de muchos adyuvantes para atraer células inflamatorias independientemente de su capacidad irritante, lo cual también contribuyen a esta reacción local.

Tabla 1 Análisis estadísticos de los resultados combinados de HET-CAM y tolerancia local *in vivo* de varios adyuvantes

	Clasificación	Estudio <i>in vivo</i>			
		No reacción	Ligera	Moderada	Severa
HET-CAM	No reacción	4	4	0	0
	Ligera	0	0	1	0
	Moderada	0	0	0	1
	Severa	0	0	0	1
Chi-cuadrado de Pearson's		Coeficiente contingencia		Coeficiente Lambda	
22.00 ($p = 0.0089$) **		0,8165		0.5000	

*La tabla de contingencia lista la frecuencia de resultados coincidentes entre los métodos para los dos métodos de evaluación tolerancia local *in vivo* y HET-CAM. ** $p < 0.01$*

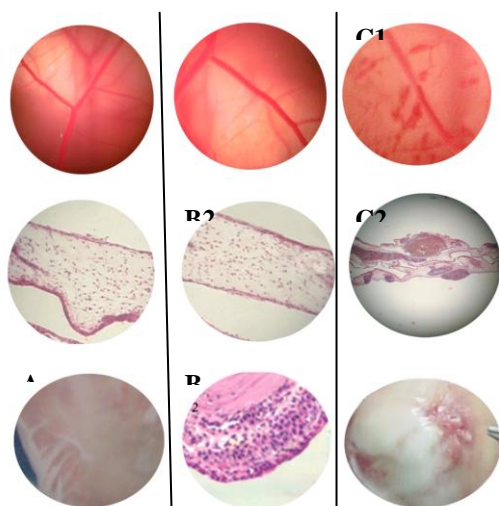


Figura 1 Imágenes representativas de los hallazgos encontrados en el HET-CAM y el método de tolerancia local *in vivo*. PANEL IZQUIERDO Cliptox™: A1) HET-CAM 3x (No reacción); A2) Membrana corioalantodea 100x (No reacción) and A3) Sitio de inoculación en tejido subcutáneo (No reacción). PANEL CENTRAL: AFCo1: B1) HET-CAM 3x (No reacción); B2) Membrana corioalantodea 100x (No reacción), B3) Epitelio nasal con leve infiltración de células inflamatorias, coloración con hematoxilina y eosina 200x. PANEL DERECHO Adyuvante Completo de Freund: C1) HET-CAM 3x Irritación severa; C2) Membrana corioalantodea (100x), coagulación y lisis celular, C3) Sitio de inoculación en tejido subcutáneo (Reacción severa con granulomas, eritema y focos hemorrágicos).

El estudio de irritación local de adyuvantes vacunales por HET-CAM puede permitir una evaluación temprana de la formulación vacunal antes del inicio de los estudios en animales de laboratorio a modo de pesquisa si se requiere seleccionar entre varios candidatos para estudios posteriores. También pueden emplearse ambos métodos combinados, para lograr una mejor comprensión de la toxicidad local utilizando Estos resultados estimulan la realización de nuevas investigaciones para validar la utilidad de este método *in vitro* como herramienta potencial para pesquisar diferentes formulaciones adyuvantes antes de los estudios *in vivo*.

Identificación *in silico* del mimetismo molecular entre epítopes t en el afco1 y el proteoma humano. valor pronóstico de autoinmunidad a nivel preclínico

En este estudio se determinó, por medio de herramientas bioinformáticas, los epítopes T CD4 y CD8 derivados de las proteínas mayoritarias de membrana externa: PorB, HmbR, FrpB, OpC y OpA de *N. meningitidis B*, así como se identificaron los sitios más relevantes donde existe mimetismo molecular para estos epítopes tanto en humanos como en ratones. Posteriormente se utilizó un ensayo de toxicidad en dos modelos de ratones para determinar la relevancia desde el punto de vista toxicológico de la existencia de mimetismo molecular entre antígenos vacunales y proteínas propias.

En nuestro estudio se detectaron similitudes secuenciales entre las proteínas estudiadas y otras presentes en diversos tejidos humanos. Lo más significativo fue la alta frecuencia de mimetismo en proteínas testiculares superando en 3 veces la frecuencia de los otros sitios. También en ratón se confirmó una alta frecuencia de mimetismo molecular entre antígenos de *N. meningitidis B* y proteínas testiculares

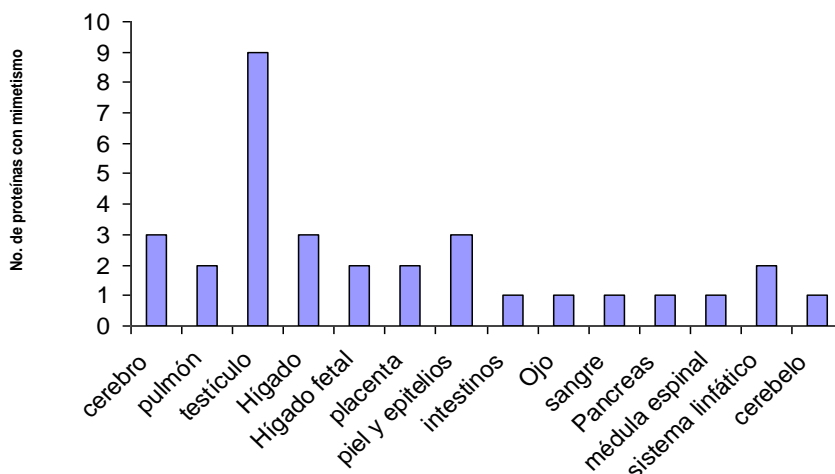


Figura 2 Frecuencia de localización de mimetismo molecular entre cinco proteínas mayoritarias de *N. meningitidis B* y proteoma humano

En un estudio de toxicidad in vivo realizado en dos líneas de ratón, no se encontraron indicios de un fenómeno autoinmune inmunizando con el AFCo1 intranasal, en las variables clínicas (signos de toxicidad), serológicas (anticuerpos anti-ADN), bioquímicas (transaminasa pirúvica y oxalacética, glicemia, urea, fosfatasa alcalina, LDH, proteínas totales) y anatomopatológicas estudiadas, a pesar de la existencia de una respuesta inmune contra los antígenos evaluados tanto por inmunotransferencia como por ELISA.

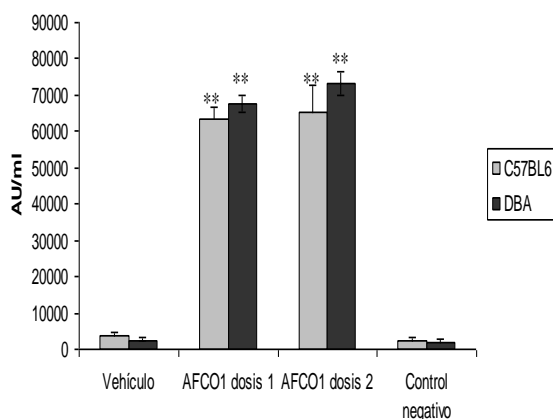


Figura 3 Respuesta IgG específica en suero de ratones tratados con dos niveles de dosis de AFCo1 intranasal a los 49 días del estudio

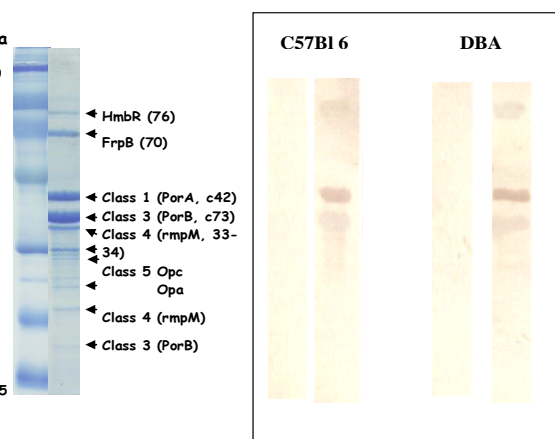
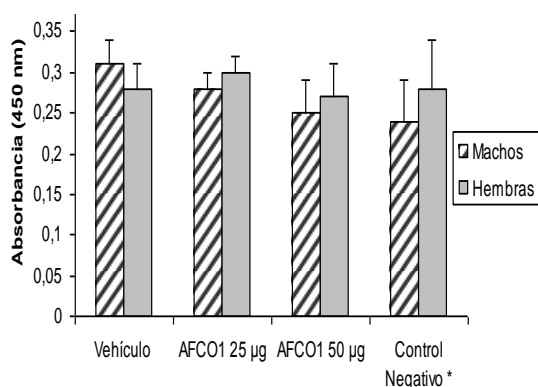


Figura 4 Inmunotransferencia (panel derecho) de mezcla de suero de ratones C57BL/6 y DBA inmunizados intranasalmente con AFCo1 a 25 mg/dosis. (C-: suero grupo control negativo). Panel izquierdo. SDS PAGE mostrando la ubicación de los antígenos proteicos contenidos en AFCo1.

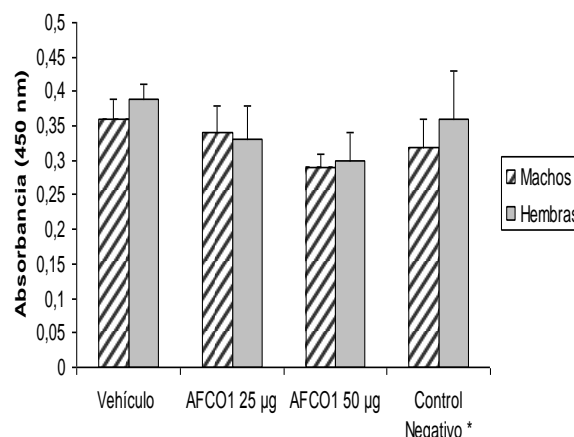


Figura 5. Comportamiento de los anticuerpos anti-ADN en suero de ratones A) C57BL/6 y B) DBA tratados con AFCo1

También se realizó un estudio de toxicidad testicular en ratones NMRI por aplicación repetida intranasal de AFCo1, donde tampoco se encontraron indicios de afectación testicular evaluada a través de la morfología y el conteo de espermatozoides, la histopatología testicular así como otros parámetros de toxicidad general.

Este resultado evidencia que a pesar de que el mimetismo es un componente importante dentro de la patogenia de la autoinmunidad, este por sí solo no es suficiente para el desarrollo de un fenómeno autoinmune, por lo que el peligro de autoinmunidad posvacunación al menos para los epítopes T de *N. meningitidis* estudiados, pudiera ser poco relevante. En esta protección son determinantes los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la cual se deletan o energizan los clones autoreactivos potencialmente dañinos desde la etapa prenatal y en la vida adulta, evitando de manera considerable el desarrollo de estas reacciones.

Alternativamente, el mimetismo molecular constituye un mecanismo que emplea *N. meningitidis* para escapar de la respuesta inmune, contribuyendo al éxito en su colonización e invasividad, lo cual también puede explicar estos resultados.

Por tanto, con los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales se concluye que la determinación del mimetismo molecular por bioinformática aporta una valiosa información como parte de la evaluación de riesgo de un producto vacunal, pero a nivel preclínico esta información tiene un valor predictivo limitado, debido a la existencia de mecanismos de control que impiden que se desarrollen estos eventos, así como a las limitaciones de los modelos actuales para detectar autoinmunidad postvacunal en animales de laboratorio.

Biomodelo cinético para la evaluación del efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre la concentración sérica de teofilina

En este estudio se evaluó el efecto del AFCo1, aplicado cuatro veces por vía intranasal en dos niveles de dosis (50 µg y 100 µg) sobre la concentración plasmática de teofilina administrada 24 horas de la última aplicación de adyuvantes (5 mg x kg via intraperitoneal) en ratas Sprague-Dawley. También se evaluaron los adyuvantes de Freund dos dosis subcutánea (primera dosis con ACF y segunda dosis con AIF). Se

registraron los signos clínicos de toxicidad a la teofilina en los animales tratados incluyendo la medición del peso corporal de los animales antes y después del estudio.

La concentración de teofilina en muestras de suero de las ratas se determinó por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC). La cuantificación de IgG específica y de IL-1 en suero se detectó por ELISA. Se realizó estudio anatómico-patológico de la cavidad nasal y del tejido subcutáneo para detectar la reacción inflamatoria local respectivamente y se realizaron determinaciones enzimáticas de ALT, AST, Glicemia, Colesterol Triglicéridos, Urea y Creatinina, a través de un analizador automático Hitachi con kit específicos procedentes de la firma Roche

Las ratas tratadas con FCA desarrollaron inflamación local asociadas a signos de toxicidad a la teofilina y elevación de las cifras de IL-1 y de las concentraciones plasmáticas, incluyendo un incremento del tiempo de vida media de teofilina en comparación con los grupos tratados con AFCo1, los cuales no estimularon una respuesta inflamatoria significativa en el sitio de inoculación, ni otros signos de toxicidad general y tampoco afectaron el comportamiento de la concentración sérica de teofilina en comparación con las ratas no tratadas.

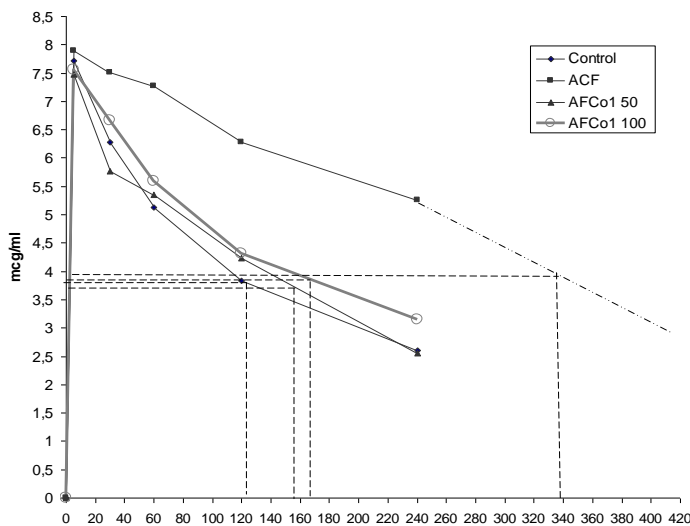
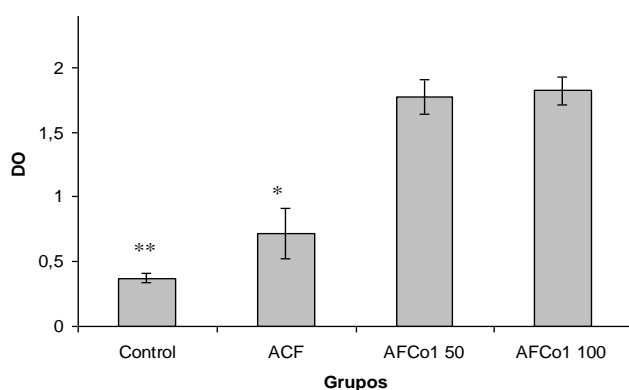


Figura 6 Efectos de la inmunización con AFCo1 intranasal sobre la cinética de concentración sérica de teofilina en ratas Sprague Dawley Hubo diferencias significativas en el Área Bajo la Curva (ABC) que representa la concentración plasmática de teofilina y en el Tiempo de Vida Media (TVM) entre el grupo tratado con AFC y el resto de los grupos ($P < 0.05$). Cada punto representa la media de la concentración plasmática de dos ratas en cada grupo. La línea discontinua de la curva en el control positivo representa un valor estimado para determinar el TVM en se grupo. También hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con AFC y el resto de los grupos a partir de los 60 minutos de evaluación.

Figura 7 Efectos de la inmunización con AFCo1 intranasal sobre la respuesta de IgG anti proteoliposoma en suero de ratas.



No se detectaron alteraciones significativas entre los grupos en lo parámetros bioquímicos evaluados

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en el modelo empleado, podemos concluir que potencialmente la respuesta inflamatoria inducida por adyuvantes puede contribuir a la afectación de la concentración sérica de teofilina. Este es un primer estudio que estimula nuevas investigaciones con este modelo, que incluyan la incorporación de otros adyuvantes conocidos como el hidróxido de aluminio, así como nuevos adyuvantes experimentales y sobre todo, profundizando en los efectos sobre las enzimas CYP y las citocinas proinflamatorias.

Conclusiones

1. El HET-CAM puede utilizarse para la evaluación de irritabilidad directa de adyuvantes vacunales.
2. El HET-CAM puede ser utilizado como parte de los ensayos de eficacia-toxicidad de adyuvantes vacunales.
3. La determinación *in silico* de mimetismo molecular de epítopes T ofrece información de interés como parte de los ensayos para la predicción de autoinmunidad de vacunas adyuvadas, aunque su alcance predictivo a nivel preclínico es limitado.
4. El modelo cinético de teofilina sérica puede ser de utilidad para evaluar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre medicamentos que se metabolizan a través de CYP.

Bibliografía básica

1. Alving, CR., Peachman. KK., Rao, M., Reed SG. 2012., Adjuvants for human vaccines. *Curr Op Immunol*, 24:310–315.
2. Balls, M 2009. Animal experimentation and the three Rs: past, present and future. *ATLA*; 37, suppl2:1-6.
3. Balls, M. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1995, 9:871-929.
4. Bender, C., Partecke, L., Kindel, E., Döring, F., Lademann, J., Heidecke, C., Kramer, A., Hübner, N,. 2011. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma *Toxicol. in vitro*, 25, 530–537.

5. Brennan, F., Dougan G. 2005. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine*, 23, 3210–3222.
6. De Groot AS, Bosma A, Chinai N, Frost J, Jesdale BM, Gonzalez MA, et al. From genome to vaccine: in silico predictions, ex vivo verification. *Vaccine* 2001;19:4385–95.
7. Descotes, J., 1985 Immunomodulating agents and hepatic drugs metabolism. *Drug Metab Rev*; 16: 175-183.
8. Fujinami, R.S., Oldstone, M.B., 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* (New York, NY 230, 1043-1045.
9. Garçon N., Segal, L., Tavares, F., Van Mechelen, M 2011. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development The AS04 experience. *Vaccine* 29: 4453–4459.
10. Garlapati, S., Facci, M., Polewicz, M., Strom, S., Babiuk, LA., Mutwiri, G., Hancock, RE., Elliott, MR., Gerdt. 2009. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 184–191
11. Girard M. 2005. Autoimmune hazards of hepatitis B vaccine. *Autoimm Rev*; 4: 96-100.
12. Glenny, A.T., Buttle, G.A.H., Stevens, M.F., 1926. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected in rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol Bacteriol* 34, 267.
13. Gribble, E.J., Sivakumar, P.V., Ponce, R.A., Hughes, S.D., 2007. Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 3, 209-234.
14. Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., Gupta, C.K., 1993. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11, 293-306.
15. Harandi, AM; Medaglini, D., Shattock, R. 2010. Vaccine adjuvants: A priority for vaccine research. *Vaccine* 28: 2363–2366.
16. Hauguel, TM., Hackett ChJ. 2008. Rationally-designed vaccine adjuvants: separating efficacy from toxicity. *Front Bioscience* 13, 2806-2813.

17. Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, Zayas C, López Y, Días D, Acevedo R, Rodríguez N, Lastre M, Fariñas M, Del Campo Y, Ponce A, Pérez O. 2009. Ensayo de inmunogenicidad y de toxicidad local del cocleato de *Neisseria meningitidis* en ratas Spregue Dawley. *VacciMonitor*; 18(1):1-7..
18. Leenaars, P.P., Koedam, M.A., Wester, P.W., Baumans, V., Claassen, E., Hendriksen, C.F., 1998. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Laboratory animals* 32, 387-406.
19. Liu Y, Zhou W, You C, Zheng H, You H, Liu H, et al. An autoimmune domain-reduced HCV core gene remains effective in stimulating anticore cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine* 2006;24(10):1615–24.
20. Luster M, Simeonova P, Gallucci R, Bruccoleri A, Blazka M, Yucesoy B, 2001. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicology Letters* 120, 317–32.
21. Marrack, P., McKee, A., Munks, M., 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 9(4): 287–293.
22. Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12, 991-1045.
23. Meroni P. 2011. Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): Old truths and a new syndrome?. *J Autoimmun*;36:1-3.
24. Mora D, Domínguez R, Duque E, Martínez L, Escoto J, Jacobo O. 2006 Adjuvants: Present regulatory challenges. *Vaccine* 24S2 (2006) S2/88–S2/89.
25. Mora D, Domínguez R, Duque E, Martínez L, Escoto J, Jacobo O. 2007. Adyuvantes: Un desafío en el ámbito regulatorio. *Info Cecmed* 12(55): 3-9.
26. Mutwiri G, Gerdts V, van Drunen S, van den Hurk L, Auray G, Eng N, Garlapati S, Babiuk L, Potter A. 2011. Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? *Expert Rev. Vaccines* 10(1), 95–107.
27. Naito M, Itoh M. 2008. Patterns of infiltration of lymphocytes into the testis under normal and pathological conditions in mice. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1):55-61.
28. O'Hagan D.T., Rappuoli R 2004. The safety of vaccines. *Drug Discov. Today.* 9(19): 846-854.

29. Orbach H, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G. 2010. Vaccines and autoimmune diseases of the adult. *Discov Med.* Feb;9(45):90-7.
30. Pérez Martín OG, Bracho Grandos GR, Lastre González M de SJB, Sierra González VG, Campa Huergo C, Mora González N, et al. Método de obtención de estructuras co-cleares. Composiciones vacúnales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. Disponible en: [http://www.ocpi.cu/boletines/boletin_244_ago_2008.pdf].
31. Pérez O, González E, Romeu B, del Campo J, Acevedo R, Lastre M, et al. Vacunas unitemporales. Patent applied OCPI, CU/P/2008/215. November 19. 2008.
32. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, González D, Gil D, et al. Proteoliposome-derived cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine* 2006, 24S2: S2/52-S2/53.
33. Petrovsky N. 2008. Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma. *Expert Rev. Vaccines* 7(1), 7–10.
34. Poland, GA. 2010a Vaccinomics and bioinformatics: Accelerants for the next golden age of vaccinology. *Vaccine* 28: 3509-3510.
35. Poland, GA. 2010b. Vaccidents and adversomics. *Vaccines* 28: 6549-6550.
36. Projean D, Lessard E, Ducharme P, Ducharme J. , 2007. 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*; 37(8): 870–88.
37. Projean, D., Dautrey, S., Vu, H.K., Groblewski, T., Brazier, J.L., Ducharme, J., 2005. Selective downregulation of hepatic cytochrome P450 expression and activity in a rat model of inflammatory pain. *Pharmaceutical research* 22, 62-70.
38. Raghupathy, R., 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* 18, 478-482.
39. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology* (30)1: 23-32
40. Renton K.W., Gray JD, Hall RI. 1980. Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination. *Can Med Assoc J*, 123: 288-290.
41. Renton, K.W., 2001. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 92, 147-163.

42. Rose, NR. 2010. Autoimmunity, infections and adjuvants. *Lupus*; 19(4): 354-358.
43. Scheel, J., Kleber, M., Kreutz, J., Lehringer, E., Mehling, A., Reisinger, K., Steiling, W. 2011. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 59, 471–492.
44. Schijns, V.E., 2001. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical reviews in immunology* 21, 75-85.
45. Seong SY, Matzinger P. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.*;4(6):469-78.
46. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 2011 "ASIA"- Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun*;36:4-8.
47. Sutkowski E.M and Gruber MF.,2006.: Regulatory considerations in the nonclinical safety assessment of adjuvanted preventive vaccines. In. Schijns, V.E. and O'Hagan D.T (eds) *Immunopotentiators in modern vaccines*. 1st edn. Elsevier Acad Press. USA, pp 343-359
48. Tritto, E., Mosca, F., De Gregorio, E., 2009. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27, 3331-3334.
49. Vargas, A, Zeisser-Labouèbe M, Lange, N., Gurny, R., Delie, F. 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems *Adv. Drug Deliv. Ver.*, 59, 1162–1176.
50. Verdier F., Barrow P., Burge J. 2003. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology* 185: 213-2
51. Vial, T., Descotes, J., 2004. Autoimmune diseases and vaccinations. *Eur J Dermatol* 14, 86-90.
52. Yang KH, Lee JH, and Lee MG 2008. Effects of CYP inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous theophylline in rats: involvement of CYP1A1/2 in the formation of 1,3-DMU. *J Pharm Pharmacol* 60: 45-53.
53. Yang, Y, Wu, Ch., Morrow, W. 2004. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine* 22,1524–1536.

54. Ying Y, Xingfen Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, Xiaohua T, Xiaoping X, Xikun X, Junming H, Xiang G. 2010 Combined in vitro tests as an alternative to in vivo eye irritation tests. *Altern Lab Anim.* 38(4):303-14.