

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANTIAGO DE CUBA  
CENTRO DE TOXICOLOGIA Y BIOMEDICINA**

**METODOS ALTERNATIVOS PARA LA EVALUACIÓN  
INMUNOTOXICOLÓGICA DE ADYUVANTES VACUNALES**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas**

**Dr. Alexander Batista Duharte**

**Santiago de Cuba  
2012**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANTIAGO DE CUBA  
CENTRO DE TOXICOLOGIA Y BIOMEDICINA**

**METODOS ALTERNATIVOS PARA LA EVALUACIÓN  
INMUNOTOXICOLÓGICA DE ADYUVANTES VACUNALES**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas**

**Autor:** Dr. Alexander Batista Duharte

**Tutores:** Dr. Oliver Pérez Martín, DrC.

**Co Tutor:** Dr. Victoriano Gustavo Sierra González, DrC.

**Asesores:** Dr. Juan Francisco Infante Bouzac, DrC.  
Jacques Descotes M.D., Pharm. D., PhD.

**Santiago de Cuba  
2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

- *A mis tutores y asesores*
- *A mis colegas y amigos de TOXIMED y del Instituto Finlay*
- *A toda mi familia*

*Por todo su apoyo y comprensión*

## DEDICATORIA

*A mi madre, mi esposa y mi hijo*

## ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ABC: Área Bajo la Curva  
ACF: Adyuvante Completo de Freund  
AIF: Adyuvante Incompleto de Freund  
ADN: Acido desoxirribonucleico  
AFCo1: Adyuvante Finlay Cocleato 1, derivado del proteoliposoma de *N. meningitidis B*  
AFPL1: Adyuvante Finlay Proteoliposoma 1, derivado de *N. meningitidis B*  
Ag: Antígeno  
AIRE: (*del inglés: autoimmune regulator*), gen regulador autoinmune  
ARN: Acido ribonucleico  
ARNm: Acido ribonucleico mensajero  
AAS: Amiloide A sérico  
AS04 (*del inglés Adjuvant systems*): sistema adyuvante 04 de la compañía Glaxo SmithKlane  
ASIA' (*del inglés: autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants*), síndrome autoinmune inflamatorio inducido por adyuvantes  
AST: Aspartato aminotransferasa  
ALT: Alanina aminotransferasa  
BCG: Bacilo Calmette-Guerin  
CCL y CXCL: Quimocinas que participan en la migración celular  
CD: Células dendríticas  
COX: Ciclooxygenasa  
CTL: Linfocitos T CD8+ citotóxicos  
CTLA-4 (*del inglés: cytolytic T lymphocyte-associated antigen*): Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos  
CYP: Citocromo P 450  
DAMPs (*del inglés: Danger-Associated Molecular Patterns*). Patrones moleculares asociados a peligros  
DE: Desviación estándar  
DO: Densidad óptica  
DS: (*del ingles 'delivery system'*), sistemas de liberación  
ECVAM: Siglas traducidas del inglés: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos  
ELISA: (*del inglés Enzyme linked immunosorbent assay*) ensayo inmunoenzimático  
Fcγ: Receptor de Inmunoglobulinas región constante gamma.  
FA: Fosfatasa alcalina  
GM1: Gangliósido presente en el sistema nervioso  
HET-CAM: (*del inglés, 'Hen's egg test on chorioallantoic membrane*), Ensayo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollos  
HLA : (*del inglés : Human Leucocyte Antigens*): Antígenos leucocitarios humanos  
HSPs: (*del inglés: Heat shock proteins*): Proteínas del choque térmico  
HBV: (*del inglés: Hepatitis B virus*): virus de la hepatitis B  
HPV: (*del inglés: Human papillomavirus*): papilomavirus humano.  
IFN γ: Interferón gamma  
IgA, IgG, IgM: Inmunoglobulinas de clase A, G, M  
IFN: interferón  
ILn; Interleucina  
IM: Intramuscular  
IN: Intranasal  
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina  
IP: Intraperitoneal  
IPz: Inmunopolarizantes  
LDH: Lactato Dehidrogenasa  
LPS: Lipopolisacárido  
MCA: Membrana corioalantoidea

MHC-n: (*del inglés: Mayor Histocompatibility Complex*): Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I ó II  
MBL: (*del inglés Mannose-binding lectin*): lectina de unión a manosa  
MPL: (*del inglés Monophosphoryl lipid A*): Monofosforil lipido A  
NCAM: (*del inglés: Neural cell-adhesion molecule*): Moléculas de adhesión de neuronas  
NLR: (*del inglés: NOD-like receptors*): Receptores tipo NOD  
NK: (*del inglés: Natural killer*) asesinas naturales  
Nalp3: un tipo de NLR conocido como inflammasoma  
ODN CPG: Adyuvantes a base de secuencias de ADN bacteriano  
OPD: Ortho-fenilendiamina  
OVA: Ovoalbúmina  
PAMP: (*del inglés: Pathogen-Associated Molecular Patterns*): Patrones moleculares asociados a patógenos  
PCR: Proteína C-reactiva  
PGE: Prostaglandina E  
PL: Proteoliposoma  
PM: Peso molecular  
RFA: Respuesta de fase aguda  
SAB: Seroalbúmina bovina  
SDS: Dodecil sulfato sodio  
SSTF: Solución salina tamponada de fosfato  
SDS PAGE: siglas traducidas del inglés: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
TCR: Receptor de células T  
Th-n: Linfocito T CD4+ auxiliador de tipo 1 ó 2  
TIM (*del inglés: T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing*)  
TGF: (*del inglés: Transformig grow factor*) factor de crecimiento epidérmico  
TLRn: Receptores semejantes a "Toll" (1-11)  
TNF  $\alpha$ : (*del inglés: Tumor necrosis factor*): Factor de necrosis tumoral alfa  
TVM: Tiempo de Vida Medio  
VLP: (*del inglés virus like particles*) partículas pseudovirales  
VME: Vesículas de membrana externa  
VSSP: nanopartículas derivadas del PL

Varias abreviaturas se mantuvieron en inglés por ser la nomenclatura más conocida y aceptada internacionalmente

## SÍNTESIS

Los adyuvantes son componentes esenciales en las vacunas, sin embargo, debido a la toxicidad, desde 1926 sólo las sales de aluminio y más recientemente otros pocos se han autorizado para emplearse en vacunas humanas. Hoy se necesitan nuevas técnicas para mejorar los estudios inmunotoxicológicos preclínicos de los adyuvantes. En esta tesis se evalúan tres **métodos alternativos** para este fin: 1) el **HET-CAM**, un método *in vitro* para la detección de irritabilidad directa y su inserción en un estudio preclínico de balance eficacia-toxicidad; 2) **herramientas bioinformáticas (*in silico*)** para la detección de mimetismo molecular entre antígenos vacunales y proteínas humanas, evaluándose la capacidad de predicción de autoinmunidad a nivel preclínico; 3) se desarrolla un **biomodelo cinético de teofilina plasmática** en ratas, para evaluar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre medicamentos que se metabolizan por vía citocromo P450. Para estos ensayos se emplearon adyuvantes en desarrollo como: AFCo1, Cliptox, Montanide IMS 1313 y 1314, así como los ya establecidos adyuvantes de Freund e hidróxido de aluminio. Se evidenció la utilidad del HET-CAM para estudios de irritabilidad directa de los adyuvantes y como parte de los ensayos preclínicos; también se demostró que la detección del mimetismo molecular entre antígenos vacunales y proteínas humanas es de gran valor, pero su alcance para la predicción de autoinmunidad a nivel preclínico es limitada y finalmente, se pudo demostrar que un biomodelo cinético de teofilina es potencialmente útil para estudiar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre la concentración plasmática de este fármaco.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1 Concepto y uso de los adyuvantes.....	9
2.2 Eficacia vs seguridad.....	10
2.3 Efectos adversos inducidos por adyuvantes vacunales.....	11
2.3.1 Reacciones adversas locales .....	11
2.3.1.1 Consideraciones especiales relacionadas con la vía intranasal.....	14
2.3.2 Efectos tóxicos sistémicos.....	16
2.3.2.1 Respuesta de fase aguda .....	16
2.3.2.2 Síndrome de escape vascular .....	17
2.3.2.3 Inducción o agravamiento de enfermedades auto inmunes .....	18
2.3.2.4 Alergia .....	20
2.3.2.5 Modificación del metabolismo hepático .....	20
2.3.2.6 Inmunotoxicidad embrio fetal .....	21
2.4 Aspectos regulatorios en los ensayos preclínicos toxicológicos de adyuvantes.....	22
2.4.1. Requisitos para la evaluación de nuevos adyuvantes establecidos por el CECMED .....	23
2.5 Métodos alternativos para la evaluación preclínica de adyuvantes vacunales.....	25
2.5.1: Estudios <i>in silico</i> (Bioinformática) .....	26
2.5.2. Métodos <i>in vitro</i> .....	26
2.5.3. Biomodelos especiales .....	27
<b>CAPÍTULO 3. HET-CAM PARA LA EVALUACIÓN DE IRRITABILIDAD DE ADYUVANTES VACUNALES</b> .....	28
3.1 Introducción.....	28
3.2. Materiales y métodos.....	29
3.2.1. Adyuvantes .....	29
3.2.2. HET-CAM .....	29
3.2.2.1 Sustancias de referencia.....	29
3.2.2.2 Procedimiento.....	30
3.2.2.3 Clasificación.....	31
3.2.3. Evaluación de tolerancia local <i>in vivo</i> .....	31
3.2.4. Análisis estadístico .....	33
3.3. Resultados y discusión.....	33
<b>Capítulo 4. APLICACIÓN DEL HET-CAM EN UN ESTUDIO DE EFICACIA-TOXICIDAD DE UN ADYUVANTE EXPERIMENTAL</b> .....	38
4.1. Introducción .....	38
4.2. Materiales y métodos.....	39
4.2.1. Ratones.....	39
4.2.2. Virus.....	39
4.2.3. Formulaciones vacunales y vacunación.....	39
4.2.4. Toxicidad local.....	40

4.2.5. Reto viral.....	40
4.2.6. Determinación de anticuerpos específicos contra VFAi. ....	41
4.2.7. Detección de anticuerpos anti VFAi IgA en saliva por ELISA.....	41
4.2.8. Determinación de isotipos de anticuerpos .....	42
4.2.9 Purificación de células esplénicas.....	42
4.2.10 Citometría de flujo.....	42
4.2.11 Análisis estadístico.....	43
4.3. Resultados y discusión.....	43
4.3.1 La formulación Cliptox™-VFAi no es tóxica a nivel local.....	43
4.3.2 La inmunización con Cliptox-VFAi confiere protección contra VFAi.....	44
4.3.3. Niveles de anticuerpos anti-VFAi inducidos por la vacuna.....	44
4.3.4. Isotipos de anticuerpos específicos contra VFAi .....	45
4.3.5. Efecto de la vacunación de Cliptox- VFAi en células dendríticas y macrófagos en el bazo.....	46
<b>CAPÍTULO 5. MIMETISMO MOLECULAR ENTRE PROTEÍNAS MAYORES DE <i>N. MENINGITIDIS</i> B Y HUMANAS Y VALOR PRONOSTICO DE AUTOINMUNIDAD POSTVACUNAL A NIVEL PRECLÍNICO .....</b>	<b>49</b>
5.1 Introducción.....	49
5.2 Materiales y Métodos.....	50
5.2.1 Determinación <i>in silico</i> de mimetismo molecular T entre proteínas de <i>N. meningitidis</i> y proteoma humano ...	50
5.2.1.1 Determinación de secuencias proteicas.....	51
5.2.1.2 Predicción de Epítopes T CD4 y CD8: Proteínas humanas.....	51
5.2.1.3 Determinación de mimetismo molecular de epítopes T CD4 y CD8 en humanos.....	52
5.2.1.4 Predicción de Epitopes T en proteínas testiculares de ratón .....	52
5.2.1.5 Determinación de mimetismo molecular de epítopes T y péptidos testiculares en ratón. ....	53
5.2.2 Toxicidad a dosis repetida intranasal de AFCo1 en ratones.....	53
5.2.2.1 Ratones C57BL6 y DBA.....	53
5.2.2.2 Administración.....	53
5.2.2.3 Mortalidad, signos clínicos, peso del cuerpo.....	54
5.2.2.4 Extracción se sangre.....	54
5.2.2.5 Estudios hematológicos.....	54
5.2.2.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.....	55
5.2.2.7 Inmunotransferencia.....	55
5.2.2.8 ELISA anti IgG específica.....	56
5.2.2.9 Análisis bioquímico del suero.....	57
5.2.2.10 Anticuerpos anti-DNA (dsDNA) .....	57
5.2.2.11 Necropsia.....	57
5.2.2.12 Análisis estadístico.....	58
5.2.3 Toxicidad en células espermáticas del adyuvante AFCo1 por via intranasal .....	58
5.2.3.1 Animales de experimentación .....	58
5.2.3.2 Productos .....	59
5.2.3.3 Administración y dosificación.....	59
5.2.3.4 Registro de peso corporal y signos clínicos.....	59

5.2.3.5 Ensayo de citotoxicidad y genotoxicidad en células espermáticas.....	59
5.2.3.6 Estudio histológico testicular.....	60
5.2.3.7 Análisis estadístico.....	60
5.3 Resultados y discusión.....	60
5.3.1 Estudios <i>in silico</i> .....	60
5.3.2 Estudios de toxicidad in vivo.....	63
5.3.3 Toxicidad en células espermáticas del adyuvante AFCo1 por vía intranasal.....	69
<b>CAPÍTULO 6. BIOMODELO CINETICO PARA LA EVALUACION DEL EFECTO DE LA INMUNOESTIMULACION POR ADYUVANTES SOBRE LA CONCENTRACION SERICA DE TEOFILINA .....</b>	<b>77</b>
6.1 Introducción.....	77
6.2 Materiales y métodos.....	78
6.2.1 Animales.....	78
6.2.2 Adyuvantes.....	78
6.2.3 Niveles de dosis, frecuencia y duración de la administración.....	78
6.2.4 Administración de teofilina.....	79
6.2.5 Observación y registro de signos clínicos.....	79
6.2.6 Toma de muestras.....	79
6.2.7 Necropsia.....	79
6.2.8 Determinación de la concentración plasmática de teofilina.....	79
6.2.9 ELISA anti IgG específica .....	80
6.2.10 Cuantificación de ALT, AST, Glicemia, Colesterol Triglicéridos, Urea y Creatinina.....	81
6.2.11 Análisis estadístico.....	81
6.3 Resultados y discusión.....	81
<b>CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>101</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
<b>AUTOBIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>124</b>

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

Las vacunas constituyen uno de los logros más importantes en la historia de la medicina, por su impacto en la prevención de las 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 y requieren de adyuvantes adicionales (Tritto y col., 2009, Reed y col., 2008).

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 (Vesikari y col., 2011; Alving y col., 2012; Behzad y col., 2012). 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 (Tritto y col., 2009), incluyendo el hidróxido de aluminio desde 1926 (Glenny y col., 1926) y esto se debe fundamentalmente a sus toxicidades (Gupta, 1993). Las reacciones inmunotóxicas inducidas por adyuvantes son muy frecuentes y van desde la **irritación local** que libera señales de daño (Marrack, 2010), la inducción de hipersensibilidad retardada (Gupta, 1993) o la reacción de Arthus (Edelman, 1980), hasta reacciones sistémicas, como los síndromes pseudogripal (Descotes y Vial, 2007) y

de escape vascular (Baluna 1997, 2007), **fenómenos autoinmunes** (Rose, 2010; Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011), la **inhibición del metabolismo de fármacos coadministrados** con incremento de sus niveles en sangre, sus toxicidades (Renton 2000, 2001) y trastornos en la morfogénesis fetal (Prater y col., 2006)

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 (Schijns, 2006, Tritto, y col., 2009, Garlapati, y col., 2009). Aunque existen varias guías reguladoras para vacunas (Sutkowski y Gruber, 2006), sólo una ha sido elaborada para adyuvantes vacunales en específico: la Guía del Comité de Productos Medicinales para uso Humano (EMA, 2005), la cual sólo confiere indicaciones generales y no profundiza en los métodos de evaluación más apropiados. Por esta razón, varios expertos ofrecen otras recomendaciones que no están totalmente incluidas en las guías reguladoras vigentes pero que pueden ser razonablemente consideradas en los ensayos caso a caso de los adyuvantes en estudio y que pudieran ser adoptadas en un futuro por las nuevas regulaciones o sus actualizaciones (Brennan y Dougan, 2005; Wolf y col., 2010; Garçon, 2011; Leitner, 2012). 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** (Brennan y Dougan, 2005; Harandi y col., 2010).

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 (Gupta, y col., 1993; Yang, y col., 2004; Yang y Shem, 2007), o de la acumulación de células inflamatorias por un efecto de depósito del adyuvante que contribuye a la toxicidad local (Wilson y col., 2010; Mutwiri y col., 2011).

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 (Brennan y Dougan, 2005). 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 (Spielmann, 1992; Ball, 1995) y ha sido aprobada por las entidades reguladoras europeas para este fin (Ying y col., 2010; Scheel y col., 2011). 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 (Takahashi, 2009), 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 capacidad de los adyuvantes vacunales para inducir respuestas inmunes protectoras con un mínimo de toxicidad debe ser debidamente evaluada durante los ensayos preclínicos, para lograr un adecuado balance riesgo-beneficio; incluso hoy se debate sí la toxicidad local es directamente proporcional a la capacidad adyuvante. Según la teoría del peligro (Matzinger, 1994), el daño tisular local es un requisito necesario para lograr una efectiva respuesta inmune, sugiriendo que la inmunogenicidad vacunal y la reactogenicidad son inseparables (Matzinger, 2001; Seong y Matzinger, 2004), como se observa en adyuvantes como los de Freund y las sales de aluminio, inductores de significativas respuestas inmunes asociadas a toxicidad local (Gupta, y col., 2003; Leenaars, y col., 1994, 1998). Sin embargo, evidencias recientes apuntan a que es posible lograr adyuvantes eficaces que no producen daño tisular en el sitio de inoculación

(Cooper y col., 1991; Infante y col., 2009; Petrovski, 2008). Teniendo en cuenta que la irritación local con daño de la membrana celular, origina reacciones inmunotóxicas en el sitio de administración de los adyuvantes, que los limitan en su uso clínico, los métodos *in vitro* pueden ayudar a detectar tempranamente reacciones de este tipo antes de continuar con otros ensayos y contribuir a los estudios de riesgo-beneficio (Brennan y Dougan, 2005). Por ello **¿podrá utilizarse el HET-CAM como parte de los estudios preclínicos para evaluar el balance eficacia-toxicidad de los adyuvantes?**

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 (Girard, 2005; Orbach y col., 2010; Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011, Moroni, 2011), aunque la mayoría de los estudios epidemiológicos no han podido confirmar esta asociación (Vial y Descotes, 2004). 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 (Fujinami y Oldstone, 1985). 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'*) (Waisbren, 2008). 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 (De Groot, y col., 2001; Brennan y Dougan, 2005; Poland, 2010; Garçon, y col., 2011). 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 (Descotes, 1985), así como el incremento de la vida media en plasma y la toxicidad de la Teofilina luego de la aplicación de vacunas de influenza (Renton, y col. 1980). 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 (Luster y col., 2001; Projean 2005, 2007; Yang y col., 2008a,b; Lacour y col., 2009). 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 (Descotes, 1985; Renton, 2001; Gribble, 2008). 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: **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**:

**General:**

Evaluar la utilidad de métodos alternativos para estudios inmunotoxicológicos de adyuvantes vacunales

**Específicos**

1. Demostrar la utilidad del **HET-CAM** para determinar la **irritación local** directa de adyuvantes vacunales;
2. Evaluar la utilidad del **HET-CAM como parte de** un estudio preclínico para evaluar el balance **eficacia-toxicidad** de un adyuvante vacunal;
3. Evaluar la utilidad de la **determinación *in silico* del mimetismo molecular** entre antígenos vacunales y propios **para pronosticar la autoinmunidad postvacunal** a nivel preclínico.
4. 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.

Estos objetivos fueron abordados en las siguientes tareas:

**Objetivo 1**

- a) Determinación del efecto irritante de los Adyuvantes Completo e Incompleto de Freund, hidróxido de aluminio; Montanide IMS 1313 VG y IMS 1314 N VG; Cliptox, y AFCo1 por HET-CAM.
- b) Determinación de la toxicidad local *in vivo* de los adyuvantes evaluados anteriormente administrados por vía subcutánea o nasal.
- c) Determinación de la asociación y concordancia entre los métodos HET-CAM y de tolerancia local *in vivo*.

## Objetivo 2

- a) Evaluación del efecto irritante por HET-CAM y la tolerancia local de una formulación de Cliptox con el Virus de la Fiebre Aftosa inactivado.
- b) Determinación de la respuesta inmune humoral, celular e innata inducida por la formulación en ratones.
- c) Evaluación de la protección inducida por la formulación en un modelo de reto viral.

## Objetivo 3

- a) Identificación por medio de herramientas bioinformáticas (*in silico*), del mimetismo molecular existente entre cinco proteínas antigénicas mayores de *N. meningitidis* serogrupo B y el proteoma humano y proteínas testiculares de ratón.
- b) Determinación de la presencia de respuesta inmune específica contra proteínas mayoritarias de *N. meningitidis* B así como la toxicidad sobre órganos y tejidos con mimetismo molecular por inmunización intranasal de AFCo1 en ratones C57BL/6 y DBA/2.
- c) Determinación del efecto de la inmunización intranasal con AFCo1 sobre la citotoxicidad de células germinales masculinas, la histopatología testicular, la densidad espermática y la morfología celular de espermatozoides en ratones NMRI

## Objetivo 4

- a) Determinación de la respuesta inmune postvacunal y la respuesta inflamatoria local en los sitios de aplicación de Adyuvantes de Freund subcutáneo y AFCo1 por vía nasal en ratas Sprague-Dawley.
- b) Determinación del área bajo la curva de la concentración y el tiempo de vida medio de la Teofilina en ratas inmunoestimuladas.
- c) Evaluación de parámetros de toxicidad general en las ratas inmunoestimuladas

La **novedad científica de esta Tesis** consiste en que: a) se usa por primera vez el HET-CAM para evaluar el potencial irritante directo de adyuvantes vacunales; b) se emplean herramientas bioinformáticas asociadas a estudios *in vivo* para determinar consecuencias biológicas del mimetismo molecular entre un adyuvante y el organismo vacunado, incluyendo el efecto sobre el sistema reproductor masculino murino y c) se introduce un modelo que evalúa los efectos de la inmunoestimulación por adyuvantes en la concentración plasmática de Teofilina. La **importancia práctica y económica** radica en que los procedimientos utilizados pueden ser introducidos para complementar la caracterización preclínica de los adyuvantes vacunales. El HET-CAM y los estudios bioinformáticos son de bajo costo y pudieran optimizar estudios posteriores más costosos. El **impacto social** es que si se logra la introducción de estos métodos como parte de los ensayos toxicológicos, esto pudiera contribuir a lograr productos vacunales más seguros. La aplicación de métodos alternativos que reducen, reemplazan o reducen el sufrimiento animal, tiene implícito un **valor ético**.

La tesis está estructurada en 7 capítulos: 1, Introducción (8 páginas); 2, Revisión Bibliográfica (19 páginas), 3, HET-CAM para la evaluación de irritabilidad local de adyuvantes vacunales (10 páginas); 4, Aplicación del HET-CAM en un estudio de eficacia-toxicidad de un adyuvante experimental (11 páginas); 5, Identificación *in silico* de mimetismo molecular entre antígenos en el AFCo1 y proteoma humano. Valor pronóstico de autoinmunidad a nivel preclínico (28 páginas); 6, Biomodelo para la evaluación del efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre las concentraciones séricas de teofilina (12 Páginas); 7, Discusión General (11 páginas); También incluye: Conclusiones (1 página) y Recomendaciones (1 página); Bibliografía (263 citas, 18 páginas); Producción científica relacionada con la tesis (3 páginas) y Anexos (15 páginas). Además, en las tres primeras páginas se muestra un índice con los epígrafes y sub-epígrafes de la tesis, seguido de una página con las abreviaturas y acrónimos empleadas en la tesis y luego la síntesis de una página.

## **CAPITULO 2 REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 Concepto y uso de los adyuvantes**

Los adyuvantes (*del latín: adjuvare, ayudar*) son sustancias de estructura química y origen muy diversos, utilizadas para reforzar la respuesta inmune contra un antígeno administrado simultáneamente (Cox y Coulter, 1997). Estos compuestos normalmente se emplean para varios propósitos: 1) formando parte de vacunas humanas (Tritto y col., 2009) o veterinarias (Spickler y Roth, 2003), con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune y memoria inmunológica suficiente para proteger contra un organismo infeccioso, o alcanzar una vacuna terapéutica antialérgica (Baldrick y col., 2007) o antitumoral (Gilboa, 2004); b) para la producción de anticuerpos poli y monoclonales para diferentes usos, (Hanly y col., 1997); c) como herramientas para estudiar la respuesta inflamatoria u obtener biomodelos de autoinmunidad (Ravel y Descotes, 2007) o d) en ensayos toxicológicos para evaluar potencial de desarrollo de hipersensibilidad (Gad, 1988).

Las vacunas de nueva generación utilizan antígenos obtenidos por métodos de purificación, sintéticos o por tecnología recombinante (Olive y col., 2001). Sin embargo, por su pequeño, tamaño son poco inmunogénicos, de ahí la necesidad de la utilización de adyuvantes eficaces y seguros para las nuevas formulaciones vacunales (Corradin y Giudice, 2005), aunque debido a aspectos de seguridad, muy pocos adyuvantes han sido autorizados para el uso en vacunas del humanas (Anexo 1): Desde la década del 1920 los adyuvantes de aluminio en forma de  $Al(OH)_3$  y  $AlPO_4$  han sido utilizados para este propósito (Glenny y col., 1926) y todavía se encuentran entre los muy escasos adyuvantes aprobados para uso humano, que incluyen: MF59, una emulsión de aceite en agua, autorizado para una formulación de vacuna contra la gripe (Fluad) hace una década (O'Hagan y col., 2007) y más recientemente, AS03, otra emulsión de aceite en agua, aceptado como un componente de una vacuna de H5N1 pre-pandémica (Prepandrix), y el AS04, una combinación de monophosphoryl lipid A (MPL), Hidróxido de aluminio y VLP

(partículas semejantes a virus), aceptado para su uso en vacunas contra HBV (Fendrix) y HPV (Cervarix) (Tritto y col., 2009). En Cuba, El Proteoliposoma (PL, vesículas de membrana externa) 1 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, se emplea en VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> desde 1988 como antígeno y adyuvante, en Cuba y Latinoamérica (Pérez O y col., Patente CU23313, 13.8.08; Pérez O y col., 10/06/204 WO 2004/047805 A1), y el VSSP (nanopartículas derivadas del PL), se ha empleado en vacunas terapéuticas (Mesa y col., 2004). El Adyuvante Finlay Cocleato 1 (AFCo1) es otro adyuvante derivado del PL de *N. meningitidis* B, transformado en presencia de iones calcio en estructuras enrolladas, multicapas y compactas. El AFCo1 ha concluido la fase experimental, la estabilidad y la preclínica toxicológica y se han desarrollado nuevos procesos en ciclo cerrado (Pérez, Patente aplicada, Cocleato con solo MAMP, CU/P/2011/123, 31/5/2011).

Otros adyuvantes han sido empleados, pero de igual modo en vacunas específicas. A pesar de estos modestos avances, no existe un adyuvante universal para todo tipo de vacuna por lo que la búsqueda de nuevos adyuvantes para las vacunas de nueva generación continúa.

## **2.2 Eficacia vs seguridad**

Generalmente se acepta que la eficacia y la toxicidad de los adyuvantes deben ser balanceadas para obtener un máximo de estimulación con un mínimo de efectos adversos (Gupta y col., 1993). Cuando se elige un adyuvante, además del uso propuesto, uno de los parámetros que deben ser considerados es la especie donde deberá ser utilizado, y el uso que tendrá la formulación, lo cual es decisivo para el nivel de efectos adversos aceptados (Leenaars y col., 1994; Leenaars y col., 1998). 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. De este modo existen dos categorías para determinar el grado de aceptación de los efectos tóxicos de los adyuvantes vacunales (Leenaars y col., 1998): 1)

Aplicaciones en las cuales la eficacia tiene prioridad en relación a la toxicidad, como sucede con el uso para la producción de anticuerpos. 2) Aplicaciones donde la toxicidad es más importante que la eficacia, como en el caso de las vacunas preventivas humanas.

### **2.3 Efectos adversos inducidos por adyuvantes vacunales**

La hiperactivación del sistema inmune por adyuvantes puede asociarse a reacciones que involucran varios mecanismos inmunológicos, y que pueden inducir reacciones locales y sistémicas (Scheibner, 2000, Hauguel y Hackett, 2008).

#### **2.3.1 Reacciones adversas locales**

La mayoría de los adyuvantes producen algún tipo de efecto 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, con manifestaciones que van desde el dolor local y eritema hasta la formación de granulomas, quistes, abscesos, úlceras y necrosis como ocurre con el ACF (Gupta y col., 1993), 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, pueden ser debido a la irritación primaria por la presencia de elementos como los hidrocarburos de cadenas cortas en algunas emulsiones, las cuales producen un efecto detergente disolviendo la bicapa lipídica de la membrana celular causando lisis celular (Stewart-Tull, 1989; Gupta y col., 1993). El Mannide monooleate, usado a menudo en las emulsiones aceite/agua como un agente emulsionante, puede metabolizarse a ácidos grasos tóxicos que causan reacciones locales (Hardegree y Pittman, 1966). También se han descrito interacciones con la membrana celular que conllevan a citólisis, como es el caso de las saponinas derivadas de *Quijalla saponaria Molina* y sus fracciones purificadas como QS-18 y QS-21 (Kensil, 1991), y el hidróxido de aluminio (Goto y col., 1997, Marrack y col., 2009).

Muchos adyuvantes inducen una notoria reacción de hipersensibilidad retardada en el sitio de administración que puede manifestarse desde una induración transitoria hasta un granuloma de mayor duración. Este efecto se produce por la migración de células inmunocompetentes al sitio de inoculación, incluyendo linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, macrófagos y otras células secretoras de citocinas como IL-1, IL-2, factor estimulante de colonias, quimocinas, y otros mediadores, causando reclutamiento celular, edema, proliferación de fibroblastos entre otras (Schijns, 2001). 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 (Gupta y col., 1993; Lindblad, 2004) y otras partículas de difícil biodegradación (Naim y col., 1997).

El reclutamiento de células de la inmunidad innata al sitio de inoculación mediada por adyuvantes, es una consecuencia de la producción local de quimioatrayentes como: CCL2, CXCL1 (Schijns, 2006; Wilson y col., 2010). Los patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMPs) (*del inglés: pathogen-associated molecular patterns*), constituyen uno de los principales estímulos para el reclutamiento de células inflamatorias. Los PAMPs incluyen componentes de la pared de células bacterianas como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y lipopéptidos, así como la flagelina, el ADN bacteriano y el ARN de doble cadena viral. Estas estructuras son reconocidas por receptores evolutivamente conservados, homólogos al gen Toll de *Drosophila* (Medzhitov y col., 1997) o TLRs (*del inglés Toll-Like Receptors*) localizados en las células de la inmunidad innata y juegan un papel crítico en la inmunidad temprana (Janeway y Medzhitoc, 2002; Jurk y col., 2002). Hasta el momento se han caracterizado 10 TLRs funcionales en humanos y 12 en murinos, de ellos TLR1–TLR9 están estructuralmente conservados en ambas especies (Kawai y Akira, 2010). Tomando en cuenta que muchos adyuvantes son generados a partir de microorganismos, ellos contienen PAMPs, por lo que los TLRs son considerados receptores de varios adyuvantes (Persing y col., 2006;

Lahiri y col., 2008), por ejemplo: ODN CpG y monophosphoryl lipid A (MPL), son agonistas de TLRs (van Duin y col., 2006).

Otra importante familia de moléculas, los NLR (*del inglés NOD-like receptors*) son sensores intracelulares de señales provenientes de microorganismos y otras señales de peligro constituyendo también un importante componente dentro de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria. Varios NLRs como NALPs y IPAF forman un complejo multiproteico activador de caspasa 1 denominado inflamasoma, el cual procesa citocinas proinflamatorias que incluyen IL-1 $\beta$  (Pétrilli y col 2007a,b). El inflamasoma NALP3 es considerado una gran sensor de varias moléculas como los peptidoglucanos bacterianos (Martín y col., 2009), LPS, RNA bacteriano, poli I:C y compuestos imidazólicos. Actualmente se reconoce que en la activación de la inmunidad innata por diversos adyuvantes está involucrada la activación directa de NLRP3 (De Gregorio, 2009)

Los NLR, además de reconocer los PAMPs, también detectan señales de peligro endógenas denominadas DAMPs (*del inglés: Danger-Associated Molecular Patterns*) (Pétrilli y col 2007b). Según la teoría del peligro, se requiere algún grado de ruptura de la integridad del tejido para el desarrollo de una respuesta inmune óptima, porque durante esta pérdida de integridad tisular se liberan o se exponen moléculas que constituyen señales de peligro o daño que estimulan la inmunidad innata (Matzinger, 1994).

Las proteínas del choque térmico o HSPs (*del inglés: heat shock proteins*), liberadas de las células necróticas debido al efecto irritante local de muchos adyuvantes, son reconocidos por las células de la inmunidad innata a través de sus TLRs y otros receptores como: LOX-1, CD91 y CD14. Diversas HSPs activan el factor NF- $\kappa$ B e inducen la maduración de células dendríticas y la secreción de citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-12, factor de necrosis tumoral y quimocinas (Srivastava y Amato, 2001; Segal y col., 2006). La actividad migratoria y

citotóxica de las células Nk también se activa por diversas HSPs, como HSP96 y HSP70 (Pillai y col., 2005; Massa y col., 2005).

Otra señal de peligro que se le está prestando gran atención en los últimos años es al ácido úrico, capaz de estimular la inmunidad innata, y participar en la patogenia de algunas enfermedades inflamatorias y que se evalúa para el desarrollo de adyuvantes vacunales (Ng y col., 2010). Estas señales de peligro, si bien son una importante contribución en las etapas iniciales de la inducción de una respuesta inmune, también contribuyen al desarrollo de efectos tóxicos locales y sistémicos (Anexo 2).

La reacción de Arthus es otro efecto local eventualmente asociado a vacunas y adyuvantes. 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 (Goldenthal y col., 1993). La deposición de inmunocomplejos estimula la inflamación dependiente del receptor Fc $\gamma$ , liberándose el factor inhibitorio de la migración (MIF), liberado por los macrófagos luego del reconocimiento de los inmunocomplejos, conllevando a un daño tisular (Magalhaes y col., 2009; Paiva y col., 2009).

**2.3.1.1 Consideraciones especiales relacionadas con la vía intranasal:** Una vía de administración novedosa y promisorio es la intranasal. La mucosa respiratoria y nasofaríngea es el principal sitio de entrada y colonización de los microorganismos patógenos, por lo que la inducción de respuesta inmune en este sitio tiene ventajas, incluso se considera una vía más segura en cuanto a efectos adversos (Slutter y col., 2008).

Gizurarson evaluó la toxicidad local de varios adyuvantes intranasalmente en curieles y encontró que el daño directo al epitelio nasal puede conllevar al contacto con las células linfoides de la submucosa o de los vasos linfáticos que drenan la zona, generando una vía de

transporte de antígenos alternativo a cuando está el epitelio intacto, que ocurre a través de las células M. Esto también pudiera llevar a una infección local oportunista local por el daño a la barrera epitelial (Gizurarzon, 1990; Gizurarson y col., 1996). Por ejemplo, después de la administración de toxina colérica por vía intranasal se observó erosión epitelial con infiltración de neutrófilos y edema alrededor de los capilares en la lámina propia (Gizurarzon y col., 1991). Una de las principales preocupaciones en el uso de la vía intranasal es la posibilidad de acceso directo al Sistema Nervioso Central a través del nervio olfatorio (Ilum, 2003). La expresión de gangliósidos GM1 en las neuronas sensoriales olfatorias podría ser una vía de entrada de enterotoxinas usadas como adyuvantes como la toxina colérica o LT de *E. coli*, (Fujihashi y col., 2002). Aunque se ha reportado que estos adyuvantes indujeron respuestas inflamatorias en las meninges, el nervio olfatorio y la capa glomerular del bulbo olfatorio (Bourguignon y col., 1999) y algunos reportes sugieren una posible relación con la enfermedad de Alzheimer (Weller, 1998), no existen suficientes evidencias que indiquen que la inmunización intranasal es peligrosa para el cerebro.

Se ha descrito una parálisis del nervio facial conocida como parálisis de Bell, después de la aplicación de una vacuna suiza inactivada contra influenza, conteniendo un mutante de LT (*Escherichia coli Heat Labile Toxin*) enzimáticamente activo por vía nasal (NasalFlu), y 46 casos de parálisis de Bell (Mutsch y col., 2004). Según este estudio hubo un intervalo de 31 a 60 días desde la vacunación hasta el inicio del cuadro clínico, lo cual apunta a un mecanismo inmunológico inducido más que a una toxicidad directa de la vacuna (Couch, 2004). Sin embargo, la falta de asociación de parálisis de Bell en formulaciones que no contienen LT, estimula a que se continúe considerando esta vía para la administración de vacunas mucosales, empleando adyuvantes alternativos a LT (Lewis y col., 2009).

### 2.3.2 Efectos tóxicos sistémicos

Los efectos tóxicos sistémicos son generalmente una consecuencia de la hiperactivación de mecanismos inmunológicos inducidos por la formulación adyuvante, asociado al paso a la circulación general de citocinas proinflamatorias, ya que los mecanismos biológicos que ellas modulan son muy poderosos. Las citocinas empleadas directamente como adyuvantes inmunológicos o liberadas como consecuencia de la immunoestimulación, están directa o indirectamente involucradas en la patogénesis de desórdenes inflamatorios descritos en humanos y animales (Vial y Descotes, 2007).

**2.3.2.1 Respuesta de fase aguda:** La immunoestimulación 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 el **síndrome "pseudogripal"** mediado por varias citocinas y otros factores humorales (Gribble y col., 2007). Esta reacción caracterizada por 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. (Descotes y Vial, 2007).

Existe un grupo de citocinas denominadas pirógenos endógenos encabezados por la IL-1, así como TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, que son capaces de penetrar el centro termorregulador en el hipotálamo a través de capilares fenestrados e inducir la producción de prostaglandinas, como PGE<sub>2</sub>, por las neuronas, microglías y astrocitos, siendo el mediador central de la fiebre (Szelenyi, 2001). La formación de PGE<sub>2</sub> depende de la actividad de la ciclooxigenasa (COX), razón por la cual la fiebre es tratada con inhibidores de la COX (COX-1 y COX-2) (Descotes y Vial, 2007), como la aspirina y los fármacos inflamatorios no esteroideos.

De este modo la RFA se inicia cuando el TNF- $\alpha$ , IL-1 y la IL-6, denominadas citocinas 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 citocinas primariamente a través de la alteración de la transcripción de genes que codifican determinadas proteínas llamadas proteínas de fase aguda (Descotes y Vial, 2007).

Varias proteínas hepáticas se elevan en el suero, como por ejemplo, varias proteínas del complemento como C2, C3, C4, C5, C9, inhibidor de C1, la proteína de unión a C4; lectinas de unión a manosa [MBL] (*del inglés Mannose-binding lectin*), Factor B, factores de la coagulación y fibrinólisis como el fibrinógeno, plasminógeno, proteína S, factor von Willebrand, proteína C-reactiva (PCR) y amiloide A sérico (AAS). Algunas de ellas como PCR y AAS, son utilizadas como biomarcadores de RFA (Gribble y col., 2007).

**2.3.2.2 Síndrome de escape vascular:** Es una reacción adversa seria observada tras la administración de IL-2 y otras citocinas (Emminger y col., 1990; Rechner y col., 2003; Baluna y Vitetta., 1997). Se caracteriza por un incremento de la permeabilidad vascular con extravasación de fluidos y proteínas, resultando en edema intersticial y fallo orgánico. Las consecuencias clínicas de estos cambios incluyen: hipotensión arterial, aumento de peso, congestión pulmonar, anasarca en casos severos y fallo cardiovascular (Baluna y Vitetta, 1997).

La patogénesis del daño endotelial es complejo y puede involucrar la activación o el daño de las células endoteliales y leucocitos, la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios como IL-1, TNF- $\alpha$ , componentes del complemento, alteración en la interacción célula- célula con el tejido conectivo, así como perturbaciones en la integridad vascular (Raffi y col., 1998, 1999; Baluna 2007). Este síndrome constituye una seria limitante para el uso de citocinas como adyuvantes vacunales (Damle y Doyle, 1989; Vial y Descotes, 1995)

**2.3.2.3 Inducción o agravamiento de enfermedades autoinmunes:** La demostrada asociación entre infección y autoinmunidad en individuos genéticamente predispuestos (Wucherpfennig 2001; Rose, 2010), ha abierto el debate en la comunidad científica acerca de la posibilidad de que las vacunas también puedan inducir fenómenos autoinmunes (Fujinami y Oldstone, 1985). Existen evidencias experimentales de que un antígeno propio administrado conjuntamente con un adyuvante puede generar en biomodelos animales sensibles una enfermedad autoinmune (Ravel y Descotes, 2007); incluso pequeños péptidos que tienen alguna similitud secuencial con estructuras propias, bajo determinadas condiciones experimentales, pueden inducir estos efectos (Fujinami y Oldstone, 1985) (Anexo 3). Existen también numerosos reportes de pacientes que han desarrollado enfermedades autoinmunes después de aplicadas determinadas vacunas sospechándose una relación causal (Herroelen y col., 1991; Gout, 1998; Rimaniol y col., 2004; Girard, 2005; Shaw y Petrik, 2009; Gherardi y col., 2001, 2012; Shoenfeld, 2011, Tomljenovic y Shaw, 2012) (Anexo 4). Aunque los estudios epidemiológicos no han confirmado esta asociación, lo cual ha generado mucho debate en este tema (Chen y col., 2001), la posibilidad de que una vacuna sea capaz de inducir un evento autoinmune no debe soslayarse, aunque la magnitud del riesgo potencial es aun desconocida.

La base para el desarrollo de un proceso autoinmune descansa en la influencia de factores genéticos asociados a factores externos, que inducen o facilitan la pérdida de la inmunotolerancia con el desarrollo de respuestas inmunes contra estructuras propias (Selmi, 2009). 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 (Santoro y col., 2010) y tal vez el haplotipo que mayor asociación presenta es el HLA-B27 con enfermedades como la espondilitis anquilosante (Braun y col., 1998).

Otros genes que pueden estar asociados al desarrollo de enfermedades autoinmunes, han sido descritos en la última década. El gen regulador autoinmune AIRE (del inglés: *autoimmune regulator*), participa en la presentación de autoantígenos durante el proceso de tolerancia central en el timo para la delección de linfocitos T autoreactivos, cuyo defecto puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes multisistémicas (Pitkanen y Peterson, 2010), asociadas a trastornos en el funcionamiento de linfocitos con función supresora del fenotipo CD4<sup>+</sup> FoxP3 o células Treg (Bynoe y Viret, 2008). También se han encontrado 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*) (Ueda y col., 2003; Anderson, 2006)

El mimetismo molecular entre estructuras microbianas y su hospedero, constituyen mecanismos de evasión de la respuesta inmune que ayudan a su patogenicidad y causan el fracaso de algunas vacunas (Lo y col., 2009), 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 (Ryan y col., 2007).

Si se analiza el otro componente de la formulación vacunal: el adyuvante, 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 (Segal y col., 2000; Rose, 2010).

Estos resultados evidencian que la presencia del adyuvante puede propiciar, bajo ciertas condiciones, una enfermedad autoinmune post-vacunal individuos genéticamente susceptibles (Waisbren, 2008), 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. Recientemente Shoenfeld y Agmon-Levin han propuesto un nuevo síndrome que se conoce con las siglas 'ASIA' (*del inglés: autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants*), e incluye cuatro entidades denominadas: siliconosis, síndrome de la guerra del Golfo, miofascitis macrofágica y fenómeno postvacunación asociado a adyuvantes, las cuales comparten varios criterios clínicos y además tienen como denominador común la exposición previa a inmunoadyuvantes (Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011). El Anexo 5 resume, según sus autores, los criterios mayores y menores que pueden servir de base para el diagnóstico de ASIA.

Aun existen varios aspectos que deben ser esclarecidos para aceptar definitivamente esta propuesta como un nuevo síndrome. Los adyuvantes pueden aparentemente jugar un rol en inducir un ASIA, sin embargo, aun falta por dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que puedan explicar que la exposición concomitante a adyuvantes y posiblemente otros agentes ambientales es la causa real de este fenómeno (Meroni, 2011).

**2.3.2.4 Alergia:** El desarrollo de reacción alérgica por los adyuvantes es un tema controversial. En general, las bases de la diferencia interindividual en la susceptibilidad a la hipersensibilidad tipo I, no han sido totalmente comprendidas. 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 (Lindblad, 2004). Contrariamente, algunos adyuvantes Th1 pueden prevenir reacciones alérgicas y consecuentemente estos han sido evaluados para su uso en vacunas contra estas enfermedades (Baldrick y col., 2002; Lastre y col., 2006).

**2.3.2.5 Modificación del metabolismo hepático:** La biotransformación de fármacos por las enzimas del sistema citocromo P450 (CYP) se inhibe por la acción de una respuesta

inflamatoria y por la administración de Bacillus Calmette Guerin (BCG) y otras vacunas (Descotes, 1985). 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 citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, TNF, TGF- $\beta$  e IFNs, están involucradas en importantes modulaciones de la expresión de muchas isoformas de CYP (Renton, 2001).

También se ha reportado un rápido decrecimiento en el contenido total de CYP en hígado de ratas tratadas con ACF y la disminución selectiva de varias isoformas específicas, 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) (Projean y col., 2005). Estas modificaciones bioquímicas y metabólicas pueden tener consecuencias farmacocinéticas y farmacodinámicas cuando los fármacos que son aclaramos en el hígado, son administradas en conjunto con ACF (Projean y col., 2007) y otros potentes inmunoestimuladores y vacunas incrementando su toxicidad (Yang y col., 2008).

**2.3.2.6 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 (Raghupathy, 1997). Un reporte reciente ha revelado que un perfil Th1 durante el embarazo puede incrementar el riesgo de malformaciones fetales. 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. El examen histológico de la placenta mostró necrosis celular, inflamación y calcificación en la capa espongiotrofoblástica entre otras alteraciones (Prater y col., 2006).

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 (Raghupathy, 1997; Szekeres-Bartho, 2002). Existe muy poca información disponible en relación con los efectos y mecanismos posibles de estos tipos de reacciones, por lo que se necesitan 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 (Verdier y col., 2003; Prater y col., 2006; Kushima y col., 2007).

#### **2.4 Aspectos regulatorios en los ensayos preclínicos toxicológicos de adyuvantes**

Durante mucho tiempo las vacunas se consideraban medicamentos de relativamente poco riesgo y los adyuvantes eran mucho menos tenidos en cuenta en este contexto. Al principio, los requerimientos y guías para el análisis del presunto riesgo en el uso de las vacunas era limitado, Sin embargo, el creciente número de reportes de sospechas de asociación entre vacunas y algunas enfermedades o trastornos en el sistema inmune, ha estimulado la emisión de guías reguladoras, que si bien aun no satisfacen todos los requerimientos, constituyen una aproximación para lograr productos más seguros (Anexo 6).

La evaluación de nuevos adyuvantes, basada en el conocimiento y la comprensión de los mecanismos del sistema inmune, así como la modulación de la respuesta inmune por dichos componentes, imponen un reto importante en la regulación de dichos productos. Los obstáculos que aparecen están caracterizados por (Mora y col., 2006, 2007): a) insuficiente conocimiento de los mecanismos de adyuvancia, b) incertidumbre en los resultados experimentales generados por las diferencias interespecies, c) la restricción genética de los animales de experimentación, condición totalmente distinta a los humanos, d) la gran diversidad de moléculas y combinaciones que se proponen como adyuvantes, que hacen muy difícil la generalización de criterios. Estos aspectos pueden explicar por qué aún no se han emitido regulaciones definitivas con respecto a los requerimientos para la evaluación de los adyuvantes

y a la insistencia en el análisis caso por caso que se aprecia en las posiciones de las agencias reguladoras internacionales y en Cuba (EMEA, 2005; Mora y col., 2006; Wolf y col., 2010).

Existen varias guías reguladoras referentes a la evaluación inmunotoxicológica de productos farmacéuticos, sin embargo, la más específica para la evaluación toxicológica de adyuvantes es la de la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA, 2005). Esta guía incluye aspectos de calidad, ensayos de eficacia y estudios no clínicos toxicológicos, así como estudios clínicos. En particular los ensayos no clínicos consideran la evaluación del adyuvante solo y en combinación con el antígeno en cuestión. Entre los ensayos que se requieren en esta guía son los de tolerancia local, inducción de hipersensibilidad y anafilaxis, pirogenicidad, toxicidad sistémica, toxicidad de la reproducción y genotoxicidad, considerando que los estudios de carcinogenicidad no son necesarios para estos productos. Según esta guía, cuando se evalúa un adyuvante con un antígeno deben evaluarse la tolerancia local considerando la proporción antígeno-adyuvante, la toxicidad a dosis repetida y la realización de una adecuada caracterización de la respuesta inmune. A pesar de ser la guía más apropiada para la evaluación preclínica de adyuvantes vacunales, puede ser perfeccionada con la inclusión de diversas variables inmunotoxicológicas que estén en concordancia con los mecanismos de inmunotoxicidad de estos productos.

#### **2.4.1 Requisitos para la evaluación de nuevos adyuvantes establecidos por el CECMED**

El Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), es la entidad reguladora en Cuba que regula y controla los aspectos relacionados con la calidad de los medicamentos de uso humano desde que están en su fase de investigación desarrollo, y los ensayos preclínicos y clínicos para el registro sanitario. El CECMED se rige por las recomendaciones surgidas de la interacción entre las agencias reguladoras internacionales y fabricantes, para establecer sus propias regulaciones. Para el caso de los adyuvantes vacunales estas estipuladas las siguientes consideraciones (Mora y col., 2006, 2007):

Previo al análisis riesgo beneficio de los nuevos adyuvantes, hay que analizar si el adyuvante es para una vacuna terapéutica o profiláctica, ya que los criterios relacionados con el riesgo/beneficio de la vacunación ponen énfasis en la seguridad sobre la eficacia cuando la vacuna es administrada en una población sana. Sin embargo, para los grupos de alto riesgo, incluyendo pacientes con cáncer y SIDA, y vacunas terapéuticas, pueden aceptarse un nivel adicional de toxicidad si el beneficio de la vacuna es significativo (Mora y col., 2007).

A) Información farmacéutica/biológica:

1. 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
2. Materiales de partida y proceso de fabricación. Demostración de la compatibilidad del adyuvante con los componentes antigénicos presentes en la vacuna a administrar
3. Grado de adsorción: Demostración de la adsorción eficiente de todos los componentes antigénicos presentes en la vacuna y como parte de los ensayos de consistencia
4. Interferencia del adyuvante sobre la capacidad de los ensayos de los componentes.
5. 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

Además de los estudios que deberán realizarse para evaluar el perfil de capacidad adyuvante y toxicidad del adyuvante dentro de la formulación y de manera independiente; los estudios preclínicos de inmunotoxicidad del adyuvante deberán ser incluidos y se consideran relevantes en las etapas de desarrollo, antes de avanzar a una fase en humanos, por ejemplo Fase I o “prueba de concepto”. Estos estudios inmunotoxicológicos incluirán:

1. Tolerancia local: Observación de reacción en el sitio de inyección, 2) Inducción de hipersensibilidad y anafilaxis, 3) Pirogenicidad, 4) Toxicidad sistémica en tejidos y órganos, 5) Toxicidad reproductiva, 6) Carcinogénesis: Cuando la estructura química o la de sus metabolitos o su mecanismo de acción tenga semejanza con productos conocidos como cancerígenos, 7) Genotoxicidad (mutagenicidad): En los casos de adyuvantes de ADN.

Los estudios farmacocinéticos (Absorción, distribución, metabolismo y excreción), 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.

## **2.5 Métodos alternativos para la evaluación preclínica de adyuvantes vacunales**

El uso de métodos alternativos a la experimentación animal constituye un principio ético ya que van a favor del bienestar del animal de laboratorio evitando sufrimientos innecesarios, cumpliendo el principio de las 3R es decir: **refinamiento**, (que significa reducción del sufrimiento animal), **reemplazamiento** y **reducción** en el número de animales de laboratorio a emplear (Spielmann, 1992; Ball, 2009). En la actualidad existen presiones reguladoras y gubernamentales así como por Organizaciones No Gubernamentales, para utilizarlos, siempre que sea posible, e incluso desarrollar y validar nuevos métodos que puedan ser incorporados a las baterías de ensayos preclínicos. Estos métodos tienen además la ventaja de que abaratan estudios y frecuentemente evitan realizar ensayos más costosos. En las investigaciones en adyuvantes y vacunas los que tienen mayores perspectiva de desarrollo son los **métodos bioinformáticos** y los **estudios *in vitro***, así como algunos **modelos especiales** aunque todavía persisten algunas limitaciones para su mayor generalización (Brennan y Dougan, 2005).

**2.5.1: Estudios *in silico* (Bioinformática):** La existencia de bases de datos de genoma y proteoma humano y de otras especies que ofrecen informaciones 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 (Hagmann y col., 2000; De Groot, 2001; Chandra y col., 2009; Gil y col., 2009; Poland, 2010a). Utilizando programas como: SWISSPROT, TrEMBL, SYFPEITHI, FASTA, u otras similares, es posible detectar epítopes T miméticos con secuencias propias y teóricamente determinar sitios con posible riesgo de autoinmunidad (Brennan y Dougan, 2005; Garçon, 2011). A pesar de la valiosa utilidad de esta herramienta, aun se requieren nuevos estudios para conocer su valor predictivo desde el punto de vista preclínico y clínico, por lo que los resultados obtenidos por esta vía deben ser analizados conjuntamente con otros ensayos.

**2.5.2. Métodos *in vitro*:** Estos ensayos se han empleado para la determinación de ciertos mecanismos farmacológicos, detectar estimulación linfocítica, y estudios de inmunotoxicidad (Gennari y col., 2005), pero también para estudios de irritación de adyuvantes como por ejemplo los ensayos de hemólisis y de citotoxicidad directa (Kensil, 1991; Yang y col., 2004). La membrana corioalantoidea de huevos embrionados de pollo se ha utilizado para estudiar respuestas inflamatorias locales después de una exposición de varios días a adyuvantes vacunales (Beck y col., 2003), por su parte el método HET-CAM, que también utiliza huevos embrionados de pocos días, y que actualmente se emplea para estudiar la irritabilidad mucosal de productos químicos, pudiera ser también de utilidad para evaluar el efecto irritante directo de adyuvantes vacunales. Los métodos *in vitro* deben tener en un futuro un mayor espacio en los estudios de toxicidad de los adyuvantes.

**2.5.3. Biomodelos 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 (*del inglés: non-obese diabetic*, ratones no obesos), o las ratas Brown Norway o BB (*bio-breeding*), los cuales desarrollan espontáneamente procesos autoinmunes (Ravel y Descotes 2007), sin embargo, los 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 (Dieter y col., 2010; Garçon y col., 2011). Alternativamente, se ha propuesto el ensayo del linfonodo local (LLNA), para evaluar autoinmunidad en fármacos y agentes químicos (Ravel y Descotes, 2007), sin embargo, se considera inapropiado para evaluar vacunas ya que el este ensayo está diseñado para detectar inmunoestimulación no intencional (Brennan y Dougan, 2005). Otros modelos para evaluar efectos aun no estudiados de los adyuvantes pudieran ser de utilidad en el esclarecimiento de su potencial inmunotóxico, por ejemplo, para determinar el efecto de la inmunoestimulación sobre el metabolismo y la farmacocinética de medicamentos coadministrados.

Indudablemente los próximos años serán determinantes en la incorporación de nuevos ensayos para una mejor caracterización y evaluación toxicológica de adyuvantes vacunales (Leitner, 2012).

## **CAPÍTULO 3. HET-CAM PARA LA EVALUACIÓN DE IRRITABILIDAD LOCAL DE ADYUVANTES VACUNALES**

### **3.1 Introducción**

La irritación local directa constituye uno de los efectos indeseados de los adyuvantes vacunales, ya que conducen a reacciones tóxicas locales, producidas por el propio efecto irritante y por la respuesta inflamatoria que se deriva de ella (inmunotoxicidad local). Según las guías reguladoras y en el interés de reducir el uso de animales de laboratorio, la valoración de la tolerancia local de los adyuvantes puede realizarse dentro del estudio de toxicidad a dosis repetida (Wolf y col., 2010). Sin embargo, al emplear este único método de evaluación, es difícil asumir la existencia de un efecto irritante primario, porque la inflamación local y otros efectos adversos observados al final del experimento, pueden ser debido a otras causas adicionales como el efecto de depósito, con la activación de la respuesta inflamatoria mediada por señales de peligro contenidas en la misma formulación (PAMPs), que no necesitan una ruptura de la integridad del tejido para activarla (Schijns, 2006). En estos casos los métodos *in vitro* pueden servir como herramienta para detectar un efecto irritante directo mediado por un daño de la integridad tisular causado por la formulación adyuvante.

El HET-CAM es un método *in vitro* desarrollado para clasificar sustancias irritantes oculares (Lüepke, 1985; Spielmann, 1992; Steiling, 1999), y aprobado en Europa (Scheel y col., 2011) como sustituto al clásico método *in vivo* de Draize en conejos (Draize y col., 1944), el cual produce sufrimiento al animal. Otros usos incluyen: estudios de bioingeniería tisular, angiogénesis/antiangiogénesis (Borges y col., 2003), de liberación de fármacos (Vargas y col., 2006), de oncología experimental (Zabielska y col., 2012), de evaluación de la respuesta inflamatoria (Bender y col., 2011), incluyendo inflamación inducida por adyuvantes vacunales (Beck y col., 2003). La versatilidad, posibilidad para usar diferentes tipos de sustancias, incluyendo aquellas insolubles en agua o sólidas, la rapidez y simplicidad de los métodos, hacen

del HET-CAM una interesante alternativa para evaluar el potencial irritante de los adyuvantes, teniendo en cuenta además la gran diversidad de estas formulaciones y el creciente interés de su empleo por vía mucosal (Takahashi, 2009).

El objetivo de este estudio es evaluar la utilidad del HET-CAM para detectar el potencial irritante directo de varios adyuvantes conocidos y otras formulaciones en desarrollo, para un futuro uso de esta técnica como parte de las evaluaciones preclínicas de tolerancia local.

## **3.2. Materiales and métodos**

### **3.2.1. Adyuvantes**

Adyuvante Completo de Freund (ACF; Difco Laboratories, Detroit, MI) formulado con 85 % aceite mineral; Bayol F) y 15 % de emulsificador (mannide monooleate) además de *Mycobacterium butiricum* (0.5 mg/ml) muertas por calor. Adyuvante Incompleto de Freund (AIF; Difco Laboratories, Detroit, MI), contiene los mismos componentes del ACF, pero sin micobacterias. Gel de hidróxido de aluminio (Al-gel) preparado por la mezcla de cloruro de aluminio en solución y de hidróxido de sodio en solución 1M, se ajustó la mezcla con HCl 1 M, llevándolo a pH 7.2; Montanide IMS 1313 VG y IMS 1314 N VG (Seppic, Paris, Francia) son dos variantes de suspensiones de nanopartículas en fase acuosa conteniendo un componente inmunoestimulante; Cliptox (Centro de Toxicología y Biomedicina [TOXIMED], Santiago de Cuba), son micropartículas de zeolita natural: clinoptilolita, suspendida en fase acuosa, y finalmente AFCo1 (Instituto Finlay, La Habana) que consiste en micropartículas de cocleatos obtenidos a partir de vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B bajo un proceder estandarizado y en condiciones controladas. Todas las formulaciones se prepararon acorde a cada especificación y procedimientos normalizados de trabajo, usando solución salina tamponada de fosfato (SSTF) como vehículo inmediatamente antes de los experimentos.

### **3.2.2. HET-CAM**

**3.2.2.1 Sustancias de referencia:** NaOH (Sigma) a 0.1 N y dodecil sulfato sodio (SDS)

(Sigma) al 1% como controles positivos (irritantes mucosales).

El estudio se llevó a cabo mediante el protocolo 47 de INVITTOX para sustancias no transparentes y sólidas, de la base de datos ERGATT/FRAME de técnicas *in vitro* en toxicología. (Spielmann 1992). Se utilizaron huevos embrionados de gallinas de la raza White Leghorn con un peso entre 50 y 60 g, Los reactivos empleados fueron NaCl al 0.9% para el lavado de la membrana, así como NaOH a 0.1 N y SDS al 1% como controles positivos.

**3.2.2.2 Procedimiento:** Los huevos se incubaron a  $37.5 \pm 0.5$  °C y humedad relativa de  $62,5 \pm 7.5\%$ , con la cámara de aire hacia arriba y sin rotar hasta que alcanzaron los 10 días de incubación. Los embriones se revisaron bajo la luz de una lámpara fluorescente para determinar su viabilidad y desechar los que presentaron algún defecto. Se abrió cuidadosamente el cascarón por la cámara de aire, para exponer la membrana blanca, la cual se humedeció con una solución de NaCl al 0.9 %. Después se colocaron otra vez en la incubadora para evitar su enfriamiento por un de tiempo entre 20 y 30 minutos antes de realizar los pasos subsiguientes. Posteriormente se retiró dicha membrana cuidadosamente con material quirúrgico oftálmico evitando dañar la MCA que quedó expuesta, evaluando su integridad y utilidad para ser usada. Se añadieron las soluciones de referencia de irritación y se observaron las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extravasculares) por un tiempo de 5 minutos, se registró el tiempo en segundos en que apareció cada una para calcular el Índice de Irritación (I.I.) a través de la siguiente fórmula:

$$I.I = \frac{301 - \text{seg H}}{300} \cdot 5 + \frac{301 - \text{seg L}}{300} \cdot 7 + \frac{301 - \text{seg C}}{300} \cdot 9$$

H = Hemorragia, L = Lisis de los vasos, C = Coagulación seg = El tiempo en segundos en que aparece cada reacción.

Se determinó el I.I. para 2 huevos con el SDS al 1 % y 2 huevos con NaOH 0.1 N. Estas dos son las sustancias de referencia que constituyen los controles positivos que recoge el protocolo y que se utilizan, además, para el montaje de la técnica. Para evaluar el efecto irritante de cada formulación, se colocó cada producto por triplicado (tres huevos) sobre la MCA directamente cubriendo no menos de la mitad de su superficie durante 5 minutos; después de este tiempo se lavó cuidadosamente con NaCl al 0.9% para eliminar la misma de la superficie de la membrana.

**3.2.2.3 Clasificación:** Se evaluó la severidad de las tres reacciones posibles (lisis, hemorragia y coagulación) a los 5 minutos de aplicadas las sustancias de ensayo, clasificándose de acuerdo a la siguiente escala:

0 = no lesión, 1 = ligera, 2 = moderada, 3 = severo/ corrosivo

Si a los 5 minutos no se detecta reacción en cualquiera de las tres variantes, clasifica como 0 y no se requiere repetir el ensayo al minuto. Si se observa alguna reacción de escala 3 en cualquiera de los tres tipos de reacciones, entonces se repite el ensayo utilizando otros tres huevos embrionados, pero con un tiempo de exposición del producto de 1 minuto y se reevalúa la reacción obtenida, utilizando la misma escala. La evaluación final de la magnitud de irritabilidad se asigna atendiendo a la puntuación más alta obtenida en tres replicas.

### **3.2.3. Evaluación de la tolerancia local *in vivo***

Se utilizaron ratones hembras de la línea Balb/c de 20 g de peso adquiridos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Los animales se mantuvieron en el vivario de TOXIMED y tratados según lo establecen los principios éticos de experimentación animal. Culminado el período de cuarentena se identificaron y distribuyeron al azar cinco ratones por grupo experimental en jaulas, Makrolón modelo 1000, conteniendo un lecho de viruta de madera no oleosa, cernida y esterilizada. Los mismos recibieron pienso para roedores con código CMO 1002 (ALYco, CENPALAB), multipropósito y convencional,

suministrado y certificado por el CENPALAB y agua fresca *ad-libitum*, la cual se le retiró 16 horas antes de cada administración.

Las salas de experimentación se mantuvieron con temperaturas de  $22.0 \pm 3.0$  °C, humedad relativa de  $55 \% \pm 10$  (límites 40-70 %) y período luz/oscuridad de 12/12 horas. Al día 0, los ratones en número de 5 por producto se inocularon subcutáneamente (sc) en la región dorsal con 100 µl de cada adyuvante formulado con SSTF (un grupo de ratones por adyuvante, incluyendo un grupo control con SSTF solo). La misma dosis se empleó para un reto al 7<sup>mo</sup> día. Para AFCo1 y Cliptox se exploró también la vía intranasal (i.n) aplicando 10 µl por cada fosa nasal de cada ratón. En el caso de AFCo1, los retos se administraron los días 5 y 10 después de la primera dosis, según las instrucciones de manufactura.

Dos semanas después de la última administración, los ratones se anestesiaron por administración i.p de 0,1 ml de ketamina (50 mg/ml). La necropsia incluyó la disección y examen del sitio de inoculación. El procesamiento histológico se realizó según los métodos estandarizados para estudio de las vías subcutáneas (Ioannou y col., 2002) e intranasal (Gizurason y col., 1996). Para la vía subcutánea, se asignó un rango de 0 a 4+ basada en las reacciones tisulares inducidas por las formulaciones de adyuvantes de la siguiente forma: 0 = no lesiones visibles; 1+ = Ligera: ligeras agregaciones de células mononucleares en el tejido subcutáneo, 2+ = Moderada: agregaciones de células mononucleares localmente extensas en el tejido subcutáneo o celulitis; 3+ = Severa: agregaciones localmente extensas de células mononucleares y necrosis en el tejido subcutáneo y músculo esquelético o celulitis y miocitis; (Adaptado de Ioannou y col., 2002). Para la vía nasal los hallazgos patológicos se adaptaron según los criterios descritos por Tengamnuay: 0 = no lesiones visibles; 1+ = ligera: hipersecreción mucosa y distensión celular, 2+ = moderado: congestión vascular y edema subepitelial, 3+ severa: necrosis epitelial, esfacelación y/o hemorragia (Tengamnuay y col., 2000).

### **3.2.4. Análisis estadístico**

La correspondencia entre el HET-CAM y el estudio *in vivo* se evaluó utilizando la prueba de chi-cuadrado de Pearson's, para un nivel de significación de 99 %, para determinar si la frecuencia observada en la distribución difiere significativamente de la frecuencia teórica en la misma distribución. La hipótesis nula se rechazó en caso de asociación entre las dos variables. El Coeficiente de Contingencia se utilizó para medir la fuerza de la asociación (rango 0-1) y el se empleó el Coeficiente Lambda para determinar la concordancia entre el método *in vivo* y el HET-CAM (rango 0-1). Se utilizó el programa Statgrafics Plus 5.1 para el análisis de los datos

### **3.3. Resultados y discusión**

Pocas veces los investigadores utilizan métodos *in vitro*, como la prueba de hemólisis (Goto y col., 1997; Kensil y col., 1991) o la citólisis en cultivos celulares (Yang y col., 2004) para el estudio del potencial irritante de adyuvantes vacunales. La amplia variedad de adyuvantes existentes con muy diversas propiedades químico-físicas, hace que sea difícil en ocasiones utilizar estos métodos. La membrana corioalantoidea (MCA) es una estructura fina altamente vascularizada formada por la fusión de la membrana alantoidea con el corion. Como tejido epitelial vascularizado y estratificado, responde a la irritación de manera similar a como ocurre en otros tejidos, especialmente en las mucosas. Estos embriones de 10 días no poseen un sistema nervioso desarrollado, por lo que no están sometidos al sufrimiento que pudiera producir una irritación severa, cumpliéndose así con el principio de las 3Rs que deben tener los métodos alternativos en toxicología (Spielmann, 1992; Ball, 2009).

Previo a la evaluación de los adyuvantes se realizó una comprobación del sistema de estudio con dos estancias irritantes conocidas: las soluciones de NaOH 0.1 N y de SDS 1M. Al evaluar estas sustancias de referencia como controles positivos, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 3.1. Como puede apreciarse, ambos valores se encuentran dentro del intervalo

esperado, según se refiere en el protocolo original, lo que indicó que el modelo estaba en óptimas condiciones.

**Tabla 3.1 Índice de irritación de los controles positivos para la técnica HET-CAM**

Sustancias de referencia de irritación	I.I calculado	I.I estimado para el sistema
NaOH 0.1 N	17.87	15 ± 3
SDS 1 %	11.82	10 ± 2

En este estudio, se seleccionaron adyuvantes conocidos (ACF, AIF, Al-gel, y Montanide IMS 1313 VG), así como adyuvantes experimentales (Montanide IMS 1314 N VG, Cliptox y AFCo1), formulados con SSTF sin antígenos para detectar la propiedad irritante intrínseca de cada producto. La tabla 3.2 muestra que los adyuvantes con efecto irritante severo o moderado en el HET-CAM, produjeron reacciones severas locales en ratones, y los adyuvantes no irritantes, indujeron una ligera reacción local o no produjeron reacción local visible.

**Tabla 3.2 Resultados de HET-CAM (irritabilidad), y el estudio in vivo de tolerancia local**

Formulación Adyuvante	Efecto esperado*	Resultado de HET-CAM	Estudio <i>in vivo</i>	
			Vía de administración	Clasificación de la reacción local
ACF / SSTF	Irritante	3	s.c	3
AIF/SSTF	Irritante	1	s.c	2
Al-gel /SSTF	Irritante	2	s.c	3
IMS 1313 VG/SSTF	No irritante	0	s.c	1
1314 N VG /SSTF	No irritante	0	s.c	0
AFCo1/SSTF	No irritante	0	s.c	1
Cliptox/SSTF	No irritante	0	i.n	1
	No irritante		s.c	0
SSTF (control vehiculo)	No irritante	0	i.n	1
	No irritante		sc	0
	No irritante		i.n	0

\* El efecto esperado se basa en los reportes de toxicidad local y efecto irritante de estas sustancias reportados por diferentes métodos en la literatura científica.

Aunque hubo una correspondencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre ambos métodos, se apreciaron sutiles diferencias al medirse cuantitativamente la concordancia entre ellos por los métodos de

Coeficiente de Contingencia y el Coeficiente Lambda, (tabla 3.3). La falta de absoluta correspondencia entre los resultados de HET-CAM y el estudio *in vivo* de tolerancia local, puede ser debido a que además del efecto irritante directo, existen diferencias entre los adyuvantes en su capacidad para atraer células inflamatorias en el sitio de administración, lo cual también contribuye a la toxicidad local (Schijns, 2006).

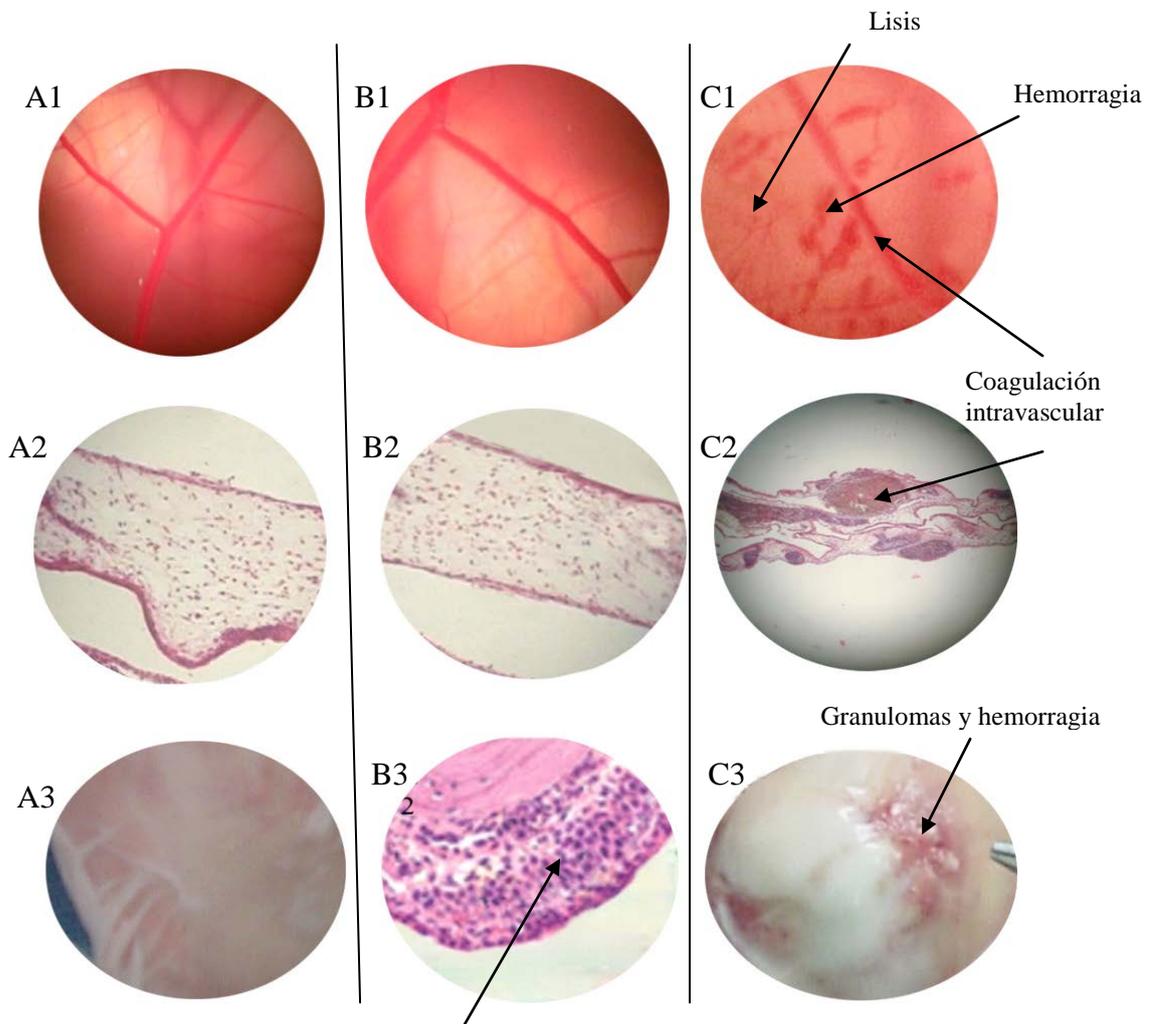
**Tabla 3.3 Análisis estadísticos de los resultados combinados de HET-CAM y tolerancia local *in vivo* de varios adyuvantes**

		Estudio <i>in vivo</i>			
		No reacción	Ligera	Moderada	Severa
HET-CAM	Clasificación				
	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. \*\*  $p < 0.01$*

La figura 3.1 muestra el aspecto de la MCA microscópico de la MCA y del sitio de administración para el caso de adyuvantes que producen irritación y toxicidad local como el ACF, el AFCo1 que produce una ligera acumulación de células inflamatorias a nivel local (mucosa nasal) sin efecto irritante directo, así como el Cliptox que no produjo efecto irritante por HET-CAM, ni toxicidad local en el estudio en ratones.

Las emulsiones y el hidróxido de aluminio son conocidos irritantes que causan una inflamación local, atrayendo a células mononucleares y neutrófilos en un infiltrado inflamatorio, satisfaciendo con esto la teoría del daño (Goto y col., 1997; Leenaars y col., 1998; Matzinger, 1994; Marrack y col., 2009). La acción irritante de estos adyuvantes liberan señales de daño que estimulan una respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación (Marrack y col., 2009), causando diversas manifestaciones clínicas, desde un ligero escozor y enrojecimiento, hasta nódulos y necrosis severa que evoluciona a una fibrosis (Gupta y col., 1993).



**Figura 3.1** Imágenes representativas de los hallazgos encontrados en el HET-CAM y el método de tolerancia local *in vivo*. PANEL IZQUIERDO Clitox™: A1) HET-CAM 3 x (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).

Por otro lado, aquellos adyuvantes que no mostraron efectos irritantes por HET-CAM tampoco indujeron en el estudio *in vivo*, signos de toxicidad local visibles, o alternativamente indujeron un efecto inflamatorio ligero en el sitio de inoculación. En el primer caso, los adyuvantes con el antígeno pueden migrar rápidamente hacia los linfonodos locales para la inducción de una

respuesta inmune efectiva sin dejar huellas de daño en el sitio de inoculación. En el segundo caso, la formulación puede demorar más tiempo en el sitio de inoculación, generando una ligera y transitoria inflamación local, a veces clínicamente imperceptible, debido al propio efecto inmunoestimulante del adyuvante, sin mediar una verdadera irritación por daño a la membrana celular. Los adyuvantes que no tuvieron efecto irritante son excelentes inmunopotenciadores (Perez y col., 2006; Batista y col., 2006; Jang y col., 2011), en contradicción con la opinión de que es necesario algún grado de daño tisular para lograr una buena adyuvanticidad (Matzinger 1994), un criterio muy debatido en la actualidad (Hauguel y Hackett, 2008).

En general, en este estudio pudo apreciarse que existe una buena correspondencia entre el efecto irritante directo e inmediato obtenido por el método HET-CAM y la toxicidad local detectada luego de varios días en el sitio de inoculación de los ratones a los que se les administraron adyuvantes. Ese resultado indica que este método alternativo *in vitro* puede ser de utilidad para el estudio de la irritabilidad de adyuvantes vacunales, contribuyendo a una mejor caracterización de la formulación vacunal antes del inicio de los estudios en animales de laboratorio, incluso a modo de pesquisaje, si se requiere seleccionar entre varios candidatos para estudios posteriores.

## **CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DEL HET-CAM EN UN ESTUDIO DE EFICACIA-TOXICIDAD DE UN ADYUVANTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Introducción**

Existe el criterio de que para lograr un adecuado efecto adyuvante, es necesario algún grado de lesión tisular en el sitio de inoculación, por lo que capacidad adyuvante y la reactogenicidad son inseparables, (Matzinger, 2001), lo cual está en consonancia con el modelo del peligro descrito por Matzinger, el cual plantea que la estimulación del sistema inmune depende de la liberación de señales de peligro que se liberan a partir de un daño celular (Matzinger, 1994). Una mirada a los adyuvantes que hoy son considerados de referencia, tales como los de Freund y el hidróxido de aluminio, los cuales desarrollan reacciones locales intensas (Gupta y col., 1993; Leenaars y col., 1994, 1998; Goto y col., 1997; Marrack y col., 2009), parece confirmar esta aseveración. Por otro lado, Naim y colaboradores estudiaron las propiedades adyuvantes y toxicidad local de sustancias como: sílica, talco, vidrio,  $Al_2O_3$ ,  $SnO_2$ ,  $ZrO_3$ , hematina y magnetita (Naim y col., 1997). Sus resultados también evidenciaron que la magnitud del efecto adyuvante estuvo en relación con la extensión e intensidad de la respuesta inflamatoria local.

A pesar de esos reportes, en algunos estudios recientes se ha encontrado que puede lograrse una adecuada estimulación de la respuesta inmune con efectos tóxicos locales mínimos (Petrovski 2008; Infante y col., 2009; Pérez y col., 2006; Batista y col., 2006), por lo que al parecer es posible lograr un buen balance seguridad-efectividad (Hauguel y Hackett, 2008), sin la necesidad .de un daño tisular a nivel local, al menos clínicamente detectable.

Las zeolitas son micropartículas de aluminosilicatos, con una acción inmunoestimuladora no específica, que actúan como superantígenos con la capacidad de activar grandes poblaciones de células T (5–20%), así como la inmunidad humoral (Ueki y col., 1994). Específicamente, sus propiedades como inmunoadyuvantes se reportaron por primera vez por Ryu y Shaey, al evaluar suspensiones del parásito *Trypanosoma gambiense* formuladas con zeolita induciendo una

protección significativa contra el desafío con el patógeno activo en ratones y conejos (Ryu y Shaey 1980, 1981). En Cuba se han reportado los efectos adyuvantes y baja toxicidad local y sistémica de una zeolita natural tipo clinoptilolita obtenida en uno de los yacimientos cubanos (Batista y col., 2006). A partir de esta zeolita se obtuvo un derivado denominado Cliptox el cual se evaluó con el virus inactivado de la fiebre aftosa (VFAi), enfermedad viral aguda del ganado, muy contagiosa, y que afecta económicamente a muchos países latinoamericanos.

En el presente capítulo se demuestra como el método *in vitro* HET-CAM puede ser utilizado como parte de un estudio de eficacia-toxicidad de un adyuvante vacunal a nivel preclínico.

## **4.2. Materiales y métodos**

**4.2.1. Ratones:** Ratones Balb/c entre 8 y 12 semanas de edad, suministrados por la Escuela de Veterinaria, de La Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas en el vivario del Instituto de Virología de INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina. El cuidado y el trabajo con los animales se realizaron siguiendo las normas directivas institucionales.

**4.2.2. Virus:** El virus Binary Ethylenimine (BEI)-desactivado (VFAi) (gentilmente suministrado por Biogenesis, Buenos Aires, Argentina) se empleó en la formulación vacunal experimental y en las pruebas ELISA. El virus contagioso, serotipo O1Campos, sirvió para el desafío viral y fue suministrado por SENASA (Buenos Aires, Argentina). Todos los estudios que contemplaron virus contagioso se realizaron en las instalaciones de NBS 3A SENASA.

**4.2.3. Formulaciones vacunales y vacunación:** Se prepararon dos tipos de formulaciones vacunales: 0.5g de VFA inactivado (VFAi) en Tampón Fosfato Salino (SSTF), y la misma formulación con 1 µg de Cliptox en SSTF (VFA-Cliptox) mezclándose cuidadosamente. Se inmunizaron varios grupos de 10 ratones Balb/c una vez (en el día 0), denominándose: (VFAi) a y (Cliptox-VFA)a; o dos veces (en el día 0 y 7) denominándose: (VFAi)b y (Cliptox-VFA)b por vía subcutánea, con un volumen de 0.2 ml. Otros animales (controles) recibieron: 1 µg de Cliptox, o SSTF. Tres grupos satélites de 5 ratones cada uno, que sólo recibieron la primera

dosis de (VFAi)<sub>a</sub> o (Cliptox-VFA)<sub>a</sub>, incluyendo un grupo sin vacunar, se sacrificaron a los 2 días post vacunación (dpv) para evaluar la toxicidad local temprana y la respuesta innata de macrófagos y células dendríticas.

**4.2.4. Toxicidad local:** Se evaluó la irritabilidad local de la formulación de VFA- Cliptox , por el HET-CAM en TOXIMED, Santiago Cuba. El procedimiento y la evaluación de la severidad de las reacciones de hemorragia, lisis y coagulación inducidas por las formulaciones vacunales se evaluó según el procedimiento descrito en INVITTOX 47 protocolo, (Spielman, 1992). El estudio de toxicidad local *in vivo* se realizó al finalizar cada experimento. Después del sacrificio de los ratones, se disecó la piel y el tejido subcutáneo y se observó macroscópicamente, así como se procesaron las muestras para estudio microscópico. Ambos procedimientos se realizaron según se describió en el capítulo 3.

**4.2.5. Reto viral:** La protección contra el VFA en el modelo del ratón está definida por la presencia o la ausencia de viremia 24 h después de la infección (López y col., 1990; Piatti y col., 1991). Brevemente, los ratones se inocularon i.p. a los 21 días postvacunación (dpv) con virus contagioso 104.5 TCID<sub>50</sub> serotipo O1C. Después de 24 horas, los animales se anestesiaron y sangraron a través de la vena retroorbital. La sangre heparinizada se colocó en placas de 48 pozos conteniendo monocapas de la línea celular BHK-21, y se incubó 40 minutos a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Luego, los monoestratos celulares se lavaron tres veces con SSTF estéril. Después se agregó medio DMEM fresco suplementado con suero fetal de ternera (SFT) y se incubó 48 h 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se consideró que los animales estaban protegidos si el monoestrato de la célula no presentó efectos citopáticos después de un pasaje ciego. En cada prueba de desafío viral, los animales inoculados con SSTF estéril se consideraron como controles positivos de infección, lo cuales siempre tuvieron viremia detectable. Se calculó el % de protección como  $100 \times (\text{ratones protegidos}/\text{ratones retados})$ .

**4.2.6. Determinación de anticuerpos específicos contra VFai:** Se utilizó un ELISA en fase líquida. Brevemente, las placas Immulon IIHB se recubrieron la noche antes a 4°C con anticuerpos anti-VFA de conejo diluido a concentración óptima en amortiguador de bicarbonato de carbonato, pH 9.6. Después de lavarse con 0.05 % Tween-20/SSTF, las placas se bloquearon con SSTF Tween (SSTF-T)/ovoalbúmina al 1% (amortiguador bloqueador) por 30 minutos a 37° C. El suero de los ratones se diluyó en serie (1:10) con amortiguador bloqueador y se agregó una cantidad fija de antígeno viral. Después de 1 hora de incubación a 37°C en agitación continua, las mezclas de suero conteniendo anticuerpos/virus se transfirieron a las placas bloqueadas, e incubaron 1 hora a 37° C. Se añadió suero de curiel anti-VFAi diluido de manera óptima en SSTF/suero bovino normal 2 %/ suero de conejo normal al 2 %, para la detección, seguido por incubación 1 hora a 37° C. Las placas se lavaron y se agregó el conjugado IgG anticuriel conjugado con peroxidasa diluido en el mismo amortiguador, seguido de incubación 1 hora a 37°C. Se empleó Ortho-phenylene-diamine (1,2-benzenediamine) dihydrochloride (SIGMA) (OPD)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la peroxidasa y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas MR 5000. Se incluyeron controles positivos y negativos adecuados cada una de las determinaciones. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo negativo de la dilución más alta de suero que causa una inhibición de desarrollo de color mayor del 50 % en los valores medios de las muestras controles.

**4.2.7. Detección de anticuerpos IgA anti-VFAi en saliva por ELISA:** Las placas Maxisorp se recubrieron desde la noche antes a 4° C con suero de conejo anti-VFA diluido en amortiguador carbonato – bicarbonato a pH 9.6. Después de tres lavados, las placas se bloquearon con solución bloqueadora de polyvinylpyrrolidona (NaCl 0.5M; SSTF; Tween-20 al 0.05 %; EDTA 1mM; polyvinylpyrrolidona al 1 %, (pH 7.2) por 60 minutos a 37° C y luego se agregó el VFai en la dilución óptima en SSTF-T. Las placas se incubaron a 37° C por 30 minutos. Luego las muestras de saliva se diluyeron 1:2 en la solución bloqueadora. Después de 1 hora de

incubación a 37° C, se lavaron las placas y se agregó una dilución óptima de conjugado anti-ratón IgA conjugado con biotina (Caltag). Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron. Se agregó el conjugado de peroxidasa (HRP)-estreptavidina y después de una incubación 1 hora a temperatura ambiente, se agregó OPD – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la enzima. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 M y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas MR 5000 (Labsystems). Las salivas de controles positivos y negativos fueron incluidas en cada placa.

**4.2.8. Determinación de isotipos de anticuerpos:** Las placas Immulon II se recubrieron la noche antes a 4° C con suero del conejo anti-VFAi diluidas en amortiguador carbonato – bicarbonato pH 9.6. Después de tres lavados, se agregó VFAi en una dilución óptima en SSTF-T. Las placas se lavaron a 37° C por 30 minutos, y luego se bloquearon con solución de polyvinylpyrrolidone (a 37° C por 45 minutos). Se agregaron las muestras de suero (1:150) a las placas estas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y luego se lavaron. Se agregó el conjugado anti-ratón biotina isotipo específico (Caltag) y se incubó por 1 hora temperatura ambiente. Después de lavadas las placas, se incubaron con conjugado streptavidina-HRP por 1 hora a temperatura ambiente, y luego con OPD – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando peroxidasa como sustrato y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas MR 5000 (Labsystems). Se incluyeron controles positivos en cada placa.

**4.2.9 Purificación de células esplénicas:** Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se disecaron. Los bazos se extrajeron cuidadosamente y se colocaron en placas Petri estériles. Después de cortar sus extremos, se inyectó 2 ml de SSTF suplementado con 10mM EDTA en cada bazo, para extraer las células de las cápsulas. Las células se centrifugaron, y se contaron en cámara Newbauer, ajustandose a las concentraciones óptimas.

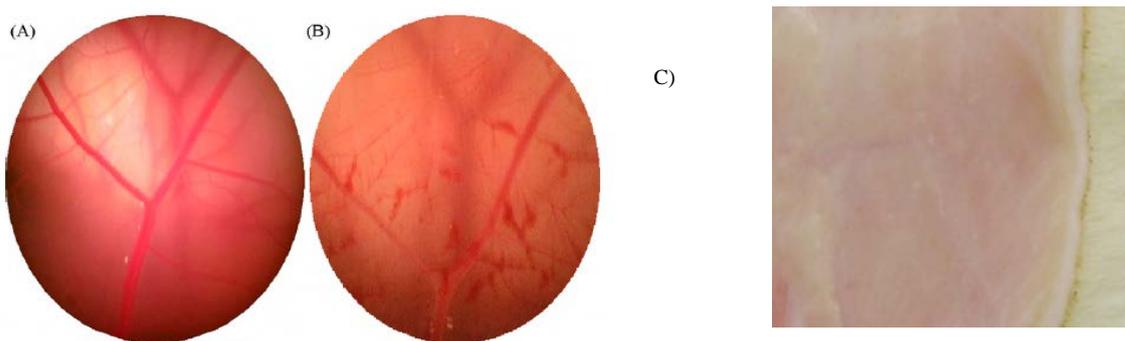
**4.2.10 Citometría de flujo:** Las suspensiones de células del bazo obtenidas dos días postvacunación se incubaron (15 minutos, 4° C) con diferentes anticuerpos marcados con FITC o

Phycoerythrin (Bioscience) diluidos en SSTF para evaluar la expresión de moléculas de superficie celular. Se emplearon los anticuerpos: CD11c/IAd (MHC class II) y F4/80/Mac3 y sus controles correspondientes de isotipo. Después de lavar las células dos veces con SSTF, los patrones de fluorescencia se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences) y con el software CellQuest. Los resultados se expresaron como porcentajes de células positivas.

**4.2.11 Análisis estadístico:** Los datos de protección se analizaron por pruebas exactas de Fisher. La prueba de análisis de varianza se usó para comparar los resultados de poblaciones celulares entre grupos. El grado de significación de diferencias en los niveles de anticuerpos totales y los isotipos entre dos grupos se analizó por la prueba de t student. El valor de la  $P < 0.05$  se consideró como un indicador de diferencias significativas.

### 4.3. Resultados y discusión

**4.3.1 La formulación Cliptox-VFAi no es tóxica a nivel local:** La toxicidad potencial de la formulación de Cliptox-VFAi evaluada en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, no mostró diferencias con sus controles negativos, señalando la no existencia de efecto irritante directo de la formulación. Tampoco hubo lesiones visibles en el sitio de inoculación al finalizar cada estudio *in vivo* en ratones (Fig. 4.1).



**Figura 4.1 Pruebas de reacción local en (A, B) HET-CAM después de la aplicación de (A) Cliptox-VFAi. Similar resultado se observó en la formulación VFAi y el control negativo (B) Control positivo de irritación con AFC. (C) Tejido subcutáneo con ausencia de signos de irritación a los 2 dpv en los grupos tratados. Similar resultado se obtuvo en el tejido subcutáneo a los 21 dpv.**

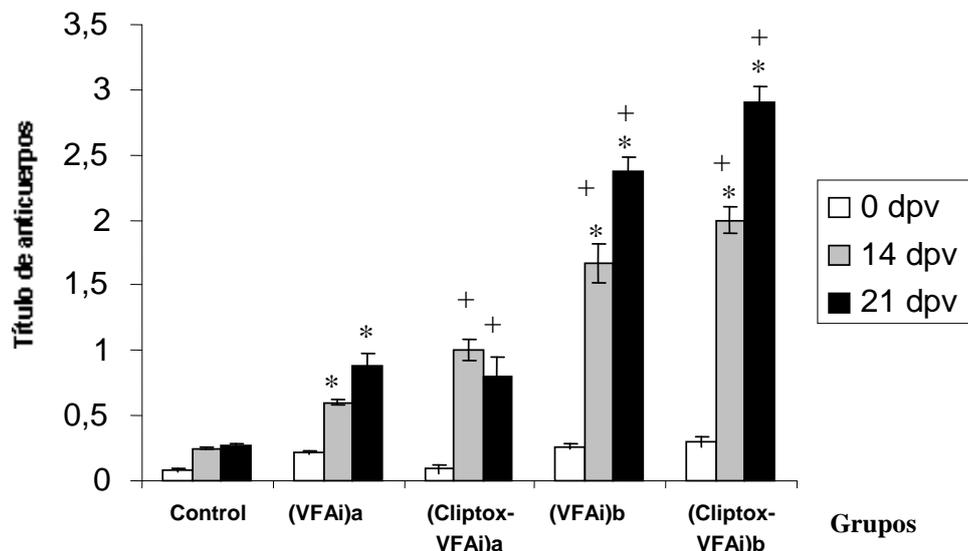
**4.3.2 La inmunización con Cliptox-VFAi confiere protección contra VFA:** El 90 % de los ratones (n = 10) inmunizados dos veces con la formulación Cliptox-VFAi estuvieron protegidos contra el reto con el virus activo, medido por la presencia o la ausencia de viremia 24 h después de la infección. Por otra parte, sólo el 20 % del grupo vacunado con VFAi estuvo protegido, mientras que todos los animales inmunizados con Cliptox o SSTF, como controles negativos, no estuvieron protegidos (Tabla 4.1) ( $p < 0,05$  para (Cliptox-VFAi) b contra (VFAi) grupo b medido por la prueba exacta Fisher. Ninguno de los ratones inmunizados con dosis única de cualquiera de las formulaciones quedó protegido contra el desafío del virus activo (datos no mostrados).

**Tabla 4.1 Niveles de protección inducidos en (VFAi) b, (Cliptox-VFAi) b o el grupo control.**

<b>Grupo</b>	<b>% protección (n=10)</b>
(Cliptox-VFAi)b	90
(VFAi)b	20
Cliptox	0
Control negativo	0

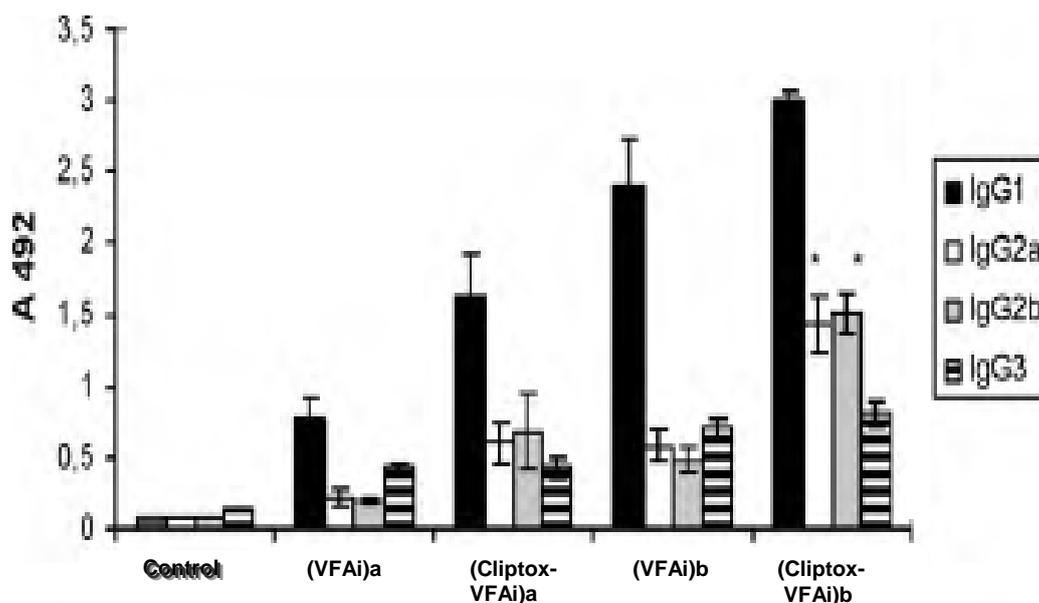
$p < 0.05$  para (Cliptox-iVFA)b versus (iVFA)b medido por la prueba exacta de Fisher

**4.3.3. Niveles de anticuerpos anti-VFAi inducidos por la vacuna:** Como se muestra en la Fig. 4.2, los ratones inmunizados subcutáneamente con (Cliptox-VFAi) b o (VFAi) mostraron títulos de anticuerpos específicos a VFAi ( $p < 0.05$ ) mayores comparados con los ratones que recibieron una sola inoculación con la mismas formulaciones. No hubo diferencias significativas observadas entre los grupos (Cliptox-VFAi) b o (VFAi) b, aunque el valor medio fue superior en los animales inmunizados con (Cliptox-VFAi) b.



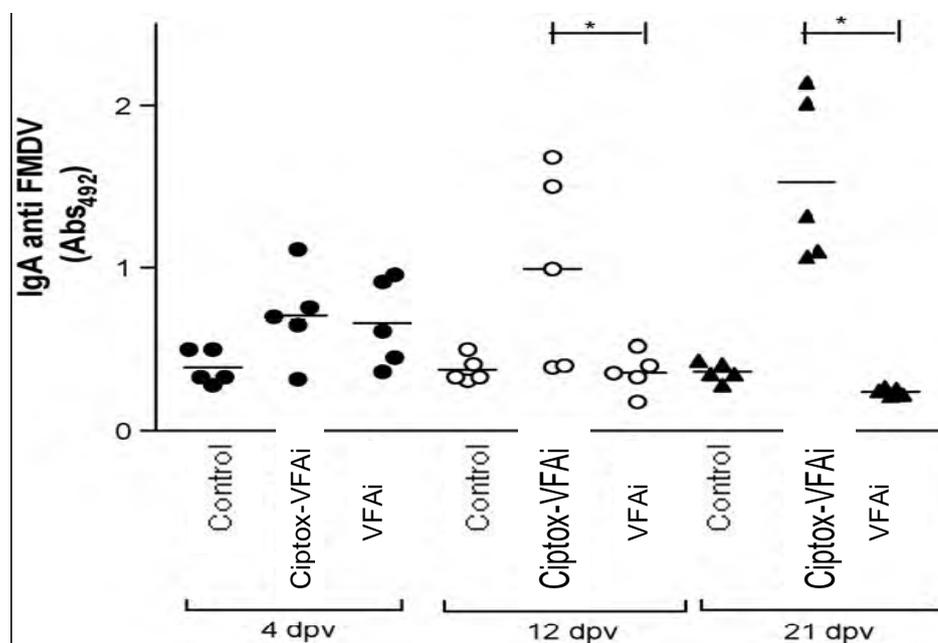
**Figura 4.2** Título de anticuerpos inducida en ratones en diferentes días postvacunación detectados por ELISA. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ): entre (VFAi)a y (VFAi)b; (Cliptox-VFAi)b a las 14 y 21 dpv, y entre (Cliptox-VFAi)a y (VFAi)b; (Cliptox-VFAi)b a los 14 y 21 dpv. También hubo diferencias significativas en un mismo grupo entre los dpv.

**4.3.4. Isotipos de anticuerpos específicos contra VFAi:** Los sueros de ratones del grupo (Cliptox-VFAi)b exhibieron un incremento significativo de isotipos IgG2a e IgG2b ( $p < 0.05$ ) en comparación con los del grupo (VFAi)b. Los títulos de IgG1 también se elevaron en el día 21 del experimento, pero esta diferencia no fue significativa entre estos dos grupos (Fig. 4.3).



**Figura 4.3** Isotipos IgG específicos inducidos por la vacunación con diferentes formulaciones en ratones Balb/c a los 21 dpv. \*Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo (iVFA)a, (Cliptox-VFAi) y el grupo (VFAi) b

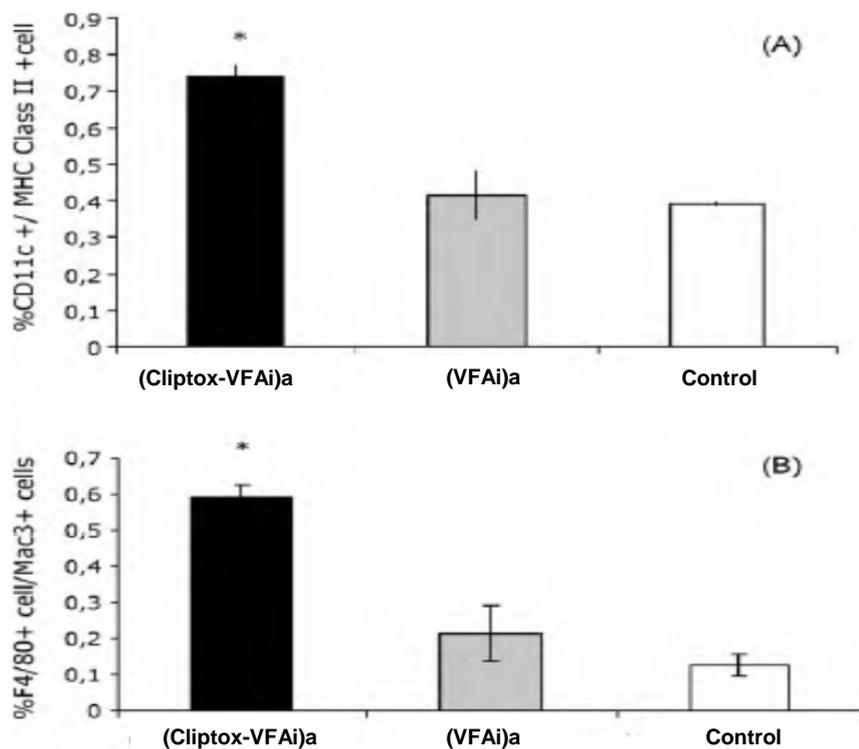
También a los 12 y 21 dpv, la IgA en saliva se elevaron significativamente en el grupo (Cliptox-VFAi) en relación al grupo (VFAi)b, ( Fig 4.4).



**Figura 4.4. Respuesta específica IgA salival** evaluada en diferentes tiempos en Balb/c machos inmunizados subcutáneamente con (VFAi)b, (Cliptox-VFAi)b o SSTF (control). Cada punto representa los valores medios de absorbancia a 492  $\pm$  SE de pruebas de saliva de 5 ratones por grupo en los días 4, 12 y 21 dpv. \*Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo (VFAi) b.

#### 4.3.5. Efecto de la vacunación de Cliptox-iVFA en células dendríticas y subpoblaciones de

**macrófagos en el bazo:** Los efectos tempranos de la estimulación inducida por las diferentes formulaciones se analizaron en ratones a los 2 dpv. Con este fin, las células del bazo de los ratones controles y vacunados una vez con (Cliptox-VFAi)a y (VFAi)a, se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos y se analizaron por citometría de flujo para cuantificar los porcentajes de células dendríticas (CD11c, MHC II positivas) y macrófagos (F4/80, Mac3 +). La fig. 4.5 muestra que la inmunización con Cliptox-VFAi produjo una expansión significativa ( $p < 0.05$ ) de las células dendríticas y poblaciones macrofágicas en el bazo en comparación con el grupo VFAi.



**Figura 4.5** Porcentaje de (A) CD11 /MHC II + (células dendríticas) y (B) Células F4/80+/Mac 3+ (macrófagos) de bazos de ratones inmunizados con (Cliptox-VFAi)a, (VFAi)a o SSTF (control) (n = 3 en cada grupo), evaluado a 2 dpv. \*Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con relación a (VFAi)a y el grupo control.

El modelo murino experimental usado se correlaciona con la respuesta inmune humoral y protectora contra VFA en el ganado vacuno (Dus Santos y col., 2000). La formulación de Cliptox-VFAi produjo un incremento en la protección contra el desafío con VFA en el modelo murino. Los diferentes perfiles de isotipos producidos como respuesta a la inoculación con esta vacuna, indican una respuesta Th1/Th2. Los títulos de anticuerpos totales contra VFA fueron similares en grupos de ratones que recibieron Cliptox-VFAi y VFAi, pero en el primer grupo, IgG2a e IgG2b estuvieron significativamente elevados. Es probable que estos isotipos de anticuerpos, conjuntamente con los macrófagos estimulados por la formulación Cliptox-VFAi, sean capaces, a través de la opsonofagocitosis, de proteger más eficazmente a los ratones del virus en comparación con el grupo inmunizado con VFAi sin Cliptox. Los niveles de IgG1, por otra parte, no difirieron significativamente en ambos grupos.

En este estudio se detectó que Cliptox-VFAi estimula altos niveles de IgA en saliva. La inducción de respuestas IgA ha estado correlacionada con protección completa contra el desafío en cerdos inmunizados con una vacuna inactiva altamente concentrada (Eble y col., 2007). Cubillos y col. reportó buenos niveles de protección asociados la inducción de IgA específica lograda por una vacuna peptídica contra VFA (Cubillos y col., 2008).

La formulación de Cliptox-VFAi también indujo un temprano incremento en las células dendríticas y macrófagos en el bazo comparado con el grupo VFAi, por lo que no se descarta que pueda activar estas células a través de una vía mediada por PRR o a través de NLR. Esta última posibilidad se apoya en el reporte de que el silicio puede activar la inmunidad innata a través del inflamasoma Nalp3 (Hornung y col., 2008; Carvalho y col., 2010).

Tomando juntos todos los resultados podemos apreciar que Cliptox, desarrolla en el modelo empleado un adecuado efecto adyuvante, no asociado a efectos tóxicos locales, al ser evaluado tanto por HET-CAM como por el estudio de tolerancia local. Este experimento muestra como el HET-CAM puede insertarse en un estudio de eficacia-toxicidad de un adyuvante experimental a nivel preclínico para detectar tempranamente la inocuidad de un producto vacunal antes de iniciar nuevos ensayos en animales.

## **CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DEL MIMETISMO MOLECULAR ENTRE EPITOPES T EN EL AFCo1 Y EL PROTEOMA HUMANO. VALOR PRONÓSTICO DE AUTOINMUNIDAD A NIVEL PRECLÍNICO**

### **5.1 Introducción**

*Neisseria meningitidis* es uno de los principales agentes causales de meningococcal meningitis y septicemia en todo el mundo (Tinsley y Nassif, 2001). Existen diversas vacunas antimeningococcicas basadas en conjugados de polisacáridos capsulares contra los serogrupos A, C, W-135 y Y. En cambio, la obtención de vacunas polisacáridicas contra el serogrupo B no ha tenido éxito debido a la pobre inmunogenicidad del polisacárido B y la similitud estructural con glicoproteínas humanas (Feavers y Pizza, 2009).

El fracaso de las vacunas polisacáridicas contra el serogrupo B de *N. meningitidis*, ha movilizado el interés por la obtención de vacunas a base de antígenos proteicos contenidos en la membrana externa (Feavers y Pizza, 2009) y de epítopes T por medio de la bioinformática (Chandra y col, 2009; Gil y col., 2009). Varios antígenos proteicos mayores abundantes en la membrana de *N. meningitidis*, juegan un importante papel en la patogénesis de la enfermedad, así como en la inducción de una respuesta inmune protectora (Hill y col., 2010; Tanabe y col., 2010), por lo que se tienen en cuenta para el desarrollo de formulaciones vacunales. Algunas de ellas como PorB, además de tener propiedades antigénicas, ejercen una importante acción como adyuvante a través de la interacción con receptores de la inmunidad innata como los receptores tipo Toll 1 y 2 (TLR-1 y TLR-2), y están implicadas en la virulencia de la bacteria (Harrison y col., 2009; Pettersson y col., 1995), reforzando su interés para la obtención de candidatos vacunales (Chiavolini y col., 2008; Wetzler, 2010).

En Cuba el empleo del preteoliposoma como base estructural de la formulación VAMENGOC-BC ha constituido la primera vacuna exitosa contra este serogrupo (Sierra y col., 1991). Varias proteínas mayoritarias de la vesícula de membrana externa (VME) de *N.*

*meningitidis*, son componentes esenciales en la vacuna VA-MENGOC-BC y de su congéner diseñado para uso intranasal, el AFCo1 (Adjuvante Finlay Cocleato 1) (Pérez y col., 2002)

La evaluación del riesgo de desarrollar una respuesta autoinmune en humanos a partir de modelos animales es difícil, debido a la complejidad etiológica, donde la susceptibilidad genética tiene un gran peso, y a pesar de los avances alcanzados en los últimos años, todavía se desconocen muchos aspectos de la etiopatogenia de estos fenómenos. Paralelamente, no contamos con modelos animales apropiados para estudiar el impacto de la vacunación en la inducción o exacerbación de estas enfermedades (Dieter, 2010). Sin embargo, teniendo en cuenta que los adyuvantes son administrados conjuntamente con antígenos proteicos, los análisis bioinformáticos pueden ofrecer valiosas informaciones acerca de la similitud secuencial o conformacional con estructuras propias que puedan teóricamente inducir el desarrollo de una respuesta autoinmune, por lo que pueden servir de herramientas para la selección de candidatos antigénicos más seguros (Garçon, 2011).

En este estudio *in silico* se determinaron, 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 en AFCo1 y proteínas propias. Posteriormente se evaluó en ratones NMRI el efecto de la inmunización intranasal repetida con este adyuvante sobre las células reproductoras masculinas.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **5.2.1 Determinación *in silico* de mimetismo molecular T entre proteínas de *N. meningitidis* y proteoma humano**

Se realizó en 3 etapas: 1) Se determinó la secuencia aminoacídica de 5 proteínas mayoritarias contenidas en la membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B: PorB, HmbR, FrpB, OpC, OpA, a través del programa UniProtKB/Swiss-Prot/TrEMBL. 2) Se determinaron los epítopes T CD4 y CD8 con el programa SYFPEITHI., 3) El programa FASTA se utilizó para determinar la localización tisular de proteínas con mimetismo molecular para epítopes T CD4 y CD8 y proteoma humano, así como el mimetismo ubicado en proteínas testiculares de ratón.

**5.2.1.1 Determinación de secuencias proteicas:** Las secuencias de aminoácidos se determinaron a través de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), usando como descriptores el nombre del antígeno proteico mayor de *Neisseria meningitidis* serogroup B CU385. Las secuencias seleccionadas fueron las siguientes: F0AV50\_NEIME, con [935597 \[NCBI\]](#) como identificador taxonómico para PorB, F0ARR9\_NEIME, [935597 \[NCBI\]](#) para HmbR, Q9JXL3\_NEIMB, [491 \[NCBI\]](#), para FrpB, Q7DDI3\_NEIMB [491 \[NCBI\]](#) para OpC. Estas secuencias están presentes tanto en VA-MENGOC-BC, la vacuna cubana antimeningocócica y sus congéneres como el AFCo1, entre otros.

**5.2.1.2 Predicción de Epítopes T CD4 y CD8: Proteínas humanas:** Para ello se empleó la base de datos SYFPEITHI (versión 1.0 del 1 de Agosto del 2007) que contiene ligandos del MHC y motivos peptídicos relacionados y está disponible en el sitio <http://www.syfpeithi.de/>. A partir de la secuencia primaria de cada una de las proteínas se obtuvieron péptidos de 9 residuos de extensión (nonámeros) que pueden ser presentados por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase-I humano, particularmente la molécula HLA-A2, y ser reconocidos por linfocitos T CD8 humanos.

En la sección Predicción de Epítopes, se seleccionó la molécula HLA-A\* 0201, se fijó la cantidad de nueve aminoácidos como longitud de los péptidos a generar y se introdujo la secuencia de trabajo. Se tomaron los primeros nonámeros con una puntuación igual o mayor que 20. Se determinó si algunos de esos péptidos u otros similares han sido reportados previamente

y se encuentran en la colección contenida en la base de datos SYFPEITHI. De la misma secuencia primaria se obtuvieron también péptidos de quince residuos de extensión con afinidad a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase-II, específicamente HLA-DRB1\* 0101, y que puedan ser reconocidos por linfocitos T CD4 humanos. Para la predicción de epítopes T con el programa SYFPEITHI se sigue una metodología descrita por Rammensee (Rammensee y col, 1997), según la cual, los epítopes naturales más probables se corresponden con el 2% de los que tienen más alta puntuación en el 80% de todas las predicciones.

#### **5.2.1.3 Determinación de mimetismo molecular de epítopes T CD4 y CD8 en humanos:**

Cada uno de los nonúmeros obtenidos en la base de datos SYFPEITHI se utilizaron para buscar proteínas humanas que tuvieran similitud en su secuencia primaria. Se utilizó el algoritmo FASTA, el cual evalúa homologías y similitudes a nivel de proteínas y genes, desarrollado por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), con fecha de última actualización 5 de noviembre del 2007, disponible en el sitio <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/genomes.html>.

Se seleccionó la base de datos de proteoma de *Homo sapiens*, el programa fasta3 y se mantuvo el resto de las opciones implícitas, con el objetivo de obtener sólo moléculas humanas. Se clasificaron y cuantificaron las moléculas obtenidas como proteínas de expresión en los diferentes tejidos, desechándose los datos de proteínas hipotéticas (que son aquellas que genera la base de datos por traducción automática de probables secuencias nucleotídicas codificadoras), los fragmentos y los precursores. Luego se procedió a localizar anatómicamente cada una de las proteínas, con la utilización de un hipervínculo (donde se muestra la descripción de cada proteína) que brinda FASTA en la tabla de resultados.

#### **5.2.1.4 Predicción de Epitopes T de proteínas testiculares de ratón.**

Para la predicción de epítopes de la especie *Mus musculus* (ratón) también se empleó la Base de datos SYFPEITHI (versión 1.0 del 1 de Agosto del 2007). En la sección Predicción de Epítopes, se seleccionó la molécula H-2 Kd, se fijó la cantidad de nueve aminoácidos como longitud de los péptidos a

generar y se introdujo la secuencia aminoacídica de las proteínas de *N. meningitidis* obtenida en el programa SWISS-PROT/TrEMBL y posteriormente se procedió de igual forma a como se refirió en el acápite 5.2.1.2.

#### **5.2.1.5 Determinación de mimetismo molecular de epítopes T y péptidos testiculares en**

**ratón:** Cada uno de los nonámeros obtenidos en la base de datos SYFPEITHI fue empleado para buscar proteínas testiculares que tuvieran similitud en su secuencia primaria. Se procedió de igual forma con el algoritmo FASTA, seleccionando la base de datos de Proteoma, el set de datos de *Mus musculus*, el programa fasta3 y se mantuvieron el resto de las opciones implícitas, con el objetivo de obtener sólo moléculas correspondiente a éste modelo experimental. Posteriormente se procedió según las condiciones citadas en el acápite anterior

Se trabajó en una computadora INTEL Pentium 4, 160 GB, 1GB de RAM, con Microsoft Windows XP Professional, conexión plena a Internet (con el navegador Mozilla Firefox 5.54 MB), para el trabajo con las bases de datos.

### **5.2.2 Toxicidad a dosis repetida intranasal de AFCo1 en ratones**

**5.2.2.1 Ratones C57BL6 y DBA/2:** Ratones hembras y machos, de la línea C57BL6 y DBA/2, entre 6-8 semanas de edad y con peso corporal entre 20-25 g, suministrados por el CENPALAB, avalados con su correspondiente certificado de salud y calidad genética.

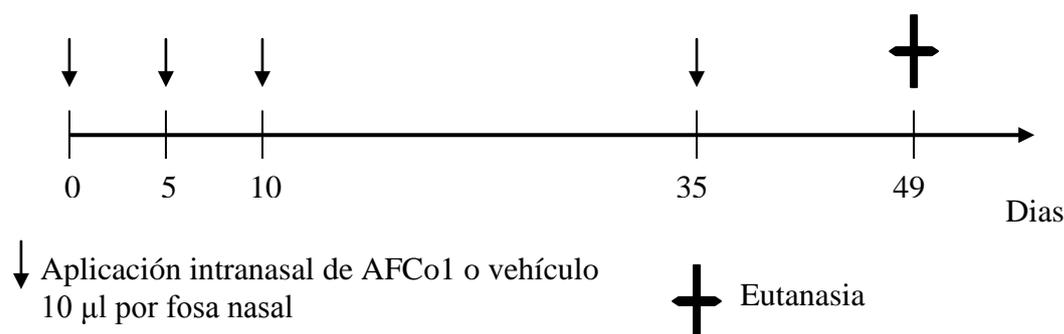
**5.2.2.2 Administración:** Los grupos de animales se organizaron de la manera que se muestra en la tabla 5.1

**Tabla 5.1. Diseño de estudio in vivo de AFCo1 en ratones C57BL6 y DBA**

Grupos	Dosis/Volumen por fosa nasal	Vía de administration	Día de Evaluación	Hembras	Machos
Vehículo	10 µl	0, 5, 10, 35	49	7	7
AFCo1 dosis 1	25 µg por dosis (10 µl)	0, 5, 10, 35	49	7	7
AFCo1 dosis 2	50 µg por dosis (10 µl)	0, 5, 10, 35	49	7	7
Control Negativo*	-	-	49	7	7

\* El control negativo no fue tratado.

La eutanasia se realizó a los 49 días del experimento



### 5.2.2.3 Mortalidad, signos clínicos, peso del cuerpo

Durante todo el estudio se realizó la evaluación clínica diaria de cada animal en busca de signos de toxicidad como alteraciones de la conducta, piloerección, diarrea, salivación, secreción e inflamación nasal u otras manifestaciones. Se obtuvo además cada 7 días el peso corporal individual en balanza digital Sartorius, determinándose la media aritmética y la desviación estándar de cada peso por grupo de estudio y por tiempo.

**5.2.2.4 Extracción de sangre:** Cada ratón fue anestesiado por vía i.p con Pentobarbital a la dosis de 50 mg/kg diluido en una solución de NaCl 0.9 % (Quimefa, Cuba), y se tomó muestra de sangre a través de la vena de la cola, el último día del experimento (49) y el suero se colectó por coagulación, luego se centrifugó durante 15 minutos, y se conservó a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis posterior.

**5.2.2.5 Estudios hematológicos:** Se realizó el conteo global de leucocitos en cámara de Newbauer. Posteriormente se realizó una extensión en lámina portaobjetos, se tiñó con

colorante Giemsa para el conteo diferencial de linfocitos, neutrófilos y monocitos por medio de un microscopio binocular. El conteo absoluto de cada población celular se calculó a partir del conteo global de leucocitos y el diferencial de manera individual.

**5.2.2.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio:** El análisis electroforético del PL contenido en el cocleato se realizó en gel de acrilamida (Merck, Alemania) al 12,5%, de 1 mm de espesor y con SDS al 0.1% (SDS-PAGE). Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/mL de proteína en el tampón para el tratamiento de las muestras (2% (p/v) SDS, 60 mmol/L TrisHCl pH 6,8, 10% (v/v) glicerol (Merck, Alemania), 0,001% (p/v) bromofenol azul (Sigma, EUA)) y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Se aplicaron 10-25 µg de proteína por carrilera. Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V, durante 90 minutos y los geles se colorearon con azul Comassie para la visualización de las bandas proteicas.

**5.2.2.7 Inmunotransferencia:** La transferencia electroforética se realizó en cámara sumergida (BioRad, EUA) durante 14-16 h, a 4°C, con una intensidad de corriente de 30 mA y se empleó una membrana de nitrocelulosa (Hybond™ -C extra, EUA). Después de la transferencia, se procedió a bloquear los sitios libres de la membrana con leche descremada (Merck, Alemania) al 5% en solución salina tamponada con fosfato 0,15 mol/L, pH 7,2 (SSTF) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió una mezcla de suero de cada grupo por separado diluidos 1:200 en SSTF con leche descremada al 1% (p/p) y Tween 20 (Sigma, EUA) al 0,01% (v/v). Las muestras se incubaron durante 14-16 horas a 4°C. En el siguiente paso se adicionó un conjugado peroxidasa (Sigma, EUA) específico contra la IgG de ratón, diluido 1:5000 en SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, previo lavado, se realizó el revelado de las bandas mediante la adición de la solución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno (0,015%, v/v) (Fluka, Suiza), diaminobencidina (Sigma, EUA) (0,5 mg/mL), dimetilsulfóxido (1%, v/v) (Merck, Alemania) y cloruro de cobalto (2%, v/v) (Merck, Alemania) en tampón citrato

(ácido cítrico 0,1 mol/L (BDH, UK) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 mol/L, pH5). Entre cada incubación se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno, con SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v).

**5.2.2.8 ELISA anti IgG específica:** La técnica de ELISA se realizó en placas de 96 pozos de alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc, EUA) que se cubrieron con una solución de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PL diluido en solución tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  11 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM (pH 9,6). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con SSTF 0,15 M (pH 7.2). Luego de bloquear con solución de bloqueo (seroalbúmina bovina (SAB) al 1% (p/v) en SSTF) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF, Tween 20 al 0,1% (v/v), pH 7,4).

El suero de referencia y los sueros a evaluar se diluyeron 1:200 en solución de bloqueo más Tween 20 al 0,1% (v/v). Se aplicaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia. Las placas se incubaron a 37 °C por 2 horas, luego se lavaron cuatro veces con SSTF. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1%, durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda.

Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con solución de lavado, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de una solución de peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno ortho-fenilendiamina (OPD) 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus) y con esta se calculó la concentración de IgG específica.

**5.2.2.9 Análisis bioquímico del suero:** Se determinaron las enzimas Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), Lactato Dehidrogenasa (LDH), Fosfatasa alcalina (FA), Glicemia, proteínas totales, Urea, utilizando un analizador automático (Hitachi, 902) con kits específicos (Roche).

**5.2.2.10 Anticuerpos anti-DNA (dsDNA):** Los niveles de anticuerpos anti-DNA (dsDNA) se determinaron en suero al final de los experimentos para todos los grupos por ELISA. Las placas Micro-ELISA (Maxisorp®) Nalge Nunc International Co. (Naperville, USA) se recubrieron con DNA (ds) de timo de ternero (Sigma) y se incubaron a 4° C toda la noche. Luego se lavaron con Tween-20 0.05% en SSTF. Se bloquearon las regiones no recubiertas por incubación a temperatura ambiente con SSTF conteniendo 1% de leche. Las muestras de suero se diluyeron en SSTF 1: 500 conteniendo 1% de leche y Tween-20 al 0.05%. Se aplicaron 100 µL/pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia e incubaron a temperatura ambiente por 1 hora y después se lavaron. Posteriormente se añadió conjugado anti-IgG de ratón con peroxidasa de rábano picante (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20, 0,1% (v/v), durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con solución de lavado, se adicionaron 100 µL/pozo de una solución de peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno ortho-fenilendiamina (OPD) 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus).

**5.2.2.11 Necropsia:** Al final de cada estudio y luego de la colección de sangre, los animales anestesiados se sacrificaron por dislocación cervical. La necropsia y el procesamiento de tejidos y los estudios histopatológicos se realizaron según los procedimientos estandarizados. Brevemente, se realizó inspección macroscópica minuciosa a todos los tejidos y órganos en

busca de signos de inflamación o daño tisular. Los órganos se disecaron, y luego se fijaron en formalina al 10%, los especímenes se incluyeron en parafina, y se seccionaron con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  y luego coloreados con hematoxilina y eosina, para su observación microscópica. Para la evaluación del efecto local intranasal se utilizó el procedimiento descrito por Gizurarson (Gizurarson y col., 1996). Para el procesamiento de los testículos se utilizó solución fijadora de Bouin durante 24 horas, luego se colocaron en solución de alcohol etílico al 70 % por varios días, incluidos en parafina y luego se siguió el mismo procedimiento del resto de los especímenes.

**5.2.2.12 Análisis estadístico:** Todos los datos son expresados como la media  $\pm$  S.D. La comparación entre grupos se llevó a cabo por un análisis de la varianza de una vía seguido por una prueba post hoc de Tukey. Las diferencias entre grupos fueron significativas si  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete Statgraphics Plus 5.1 (StatSoft).

### **5.2.3 Toxicidad en células espermáticas del adyuvante AFCo1 por vía intranasal**

**5.2.3.1 Animales de experimentación.** Ratones machos, de la línea NMRI entre 8-12 semanas de edad y con peso corporal entre 27-30 g., suministrados por CENPALAB, con su certificado de salud y calidad genética. Los animales se mantuvieron en el vivario de TOXIMED. Culminado el período de cuarentena se identificaron y distribuyeron al azar cinco ratones por grupo experimental (AFCo1, vehículo, control positivo y control negativo) en cajas, Makrolón modelo 1000, conteniendo estas un lecho de viruta de madera no oleosa, cernida y esterilizada. Los mismos recibieron pienso para roedores con código CMO 1002 (ALYco, CENPALAB), multipropósito y convencional, suministrado y certificado por el CENPALAB y agua *ad-libitum*. Las salas de experimentación se mantuvieron con temperaturas de  $22. \pm 3$  °C, humedad relativa de  $55 \% \pm 10$  y período luz/oscuridad de 12/12 horas. Los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética institucional.

**5.2.3.2 Productos.** Se emplearon dos sustancias de referencia, en este caso la Ciclofosfamida liofilizada como control positivo (Korea United Pharmaceutical Inc), conservada a temperatura entre 20-25 °C y agua destilada estéril como control negativo. Las dos sustancias restantes constituidas por el candidato a adyuvante AFCo1 y su vehículo del lote 603. (Instituto Finlay, La Habana), se conservaron a temperatura de 4 °C en envases transparentes que contenían 1.5 ml del producto.

**5.2.3.3 Administración y dosificación.** Durante el período experimental (35 días) las administraciones se realizaron en las primeras horas del día, cinco veces seguidas con intervalo de 24 horas durante los primeros 5 días del experimento. En el caso específico del AFCo1 la dosis ensayada fue de 40 µg de cocleatos en 40 µL (20 µL por fosa nasal) y la de su vehículo (sin cocleatos) de 40 µL (20 µL por fosa nasal). A los animales pertenecientes al control positivo (5 animales) se les administró 40 mg/kg de peso corporal de Ciclofosfamida y a los pertenecientes al control negativo (5 animales) se le suministró agua destilada estéril a una dosis de 1 mL/kg de peso corporal, por vía oral en ambos casos. A través de una sonda intragástrica # 8 (Vygon, Francia).

**5.2.3.4 Registro de peso corporal y signos clínicos:** Se registró el peso corporal durante los días 0, 6, 18 y 35, para detectar posibles variaciones asociadas al tipo de sustancia y vía de administración. Después de cada administración, se realizaron observaciones clínicas a los animales dos veces al día las cuales incluyeron: cambios en la piel, piloerección, alopecia, disnea, inapetencia, diarreas, actividad motora, comportamiento social, temblores, convulsiones, salivaciones, letargo, sueño y coma. A los 35 días de iniciado el estudio y previo ayuno de 12 horas, se practicó el sacrificio por dislocación cervical.

**5.2.3.5 Ensayo de citotoxicidad y genotoxicidad en células espermáticas.** Inmediatamente después del sacrificio, se obtuvo la suspensión espermática de cada testículo (1 mL). Para el conteo y registro de anomalías en la morfología espermática, según clasificación de

Wyrobeck y Bruce (Wyrobeck y Bruce, 1975). Se tomó 0.5 mL de la suspensión espermática total obtenida, la cual se tiñó con una solución acuosa de eosina al 1%. Culminado el proceso de tinción las láminas se dejaron reposar durante 15 minutos y se procedió a la observación microscópica para obtener la frecuencia de aparición de anomalías morfológicas (sin gancho, banana, amorfo) (Anexo 10), por cada 1000 células contadas. Los restantes 0.5 mL de la suspensión espermática se utilizaron para cuantificar los espermatozoides con la ayuda de la cámara de Newbauer.

**5.2.3.6 Estudio histológico testicular:** Para el procesamiento de los testículos se utilizó solución fijadora de Bouin durante 24 horas, luego se colocaron en solución de alcohol etílico al 70 % por varios días, incluidos en parafina y al final se seccionaron con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  y luego coloreados con hematoxilina y eosina, para su observación microscópica

**5.2.3.7 Análisis estadístico.** Para la identificación de variaciones estadísticamente significativas del peso corporal en los cuatro grupos experimentales, durante los días 0, 6, 12, 18, 35 del estudio (datos relacionados), se utilizó una ANOVA bifactorial (días pesaje y grupo experimental) de medidas repetidas y posteriormente una comparación múltiple de componentes principales, con corrección de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Para los restantes indicadores de toxicidad se utilizó la prueba de Games Howell ( $p < 0.05$ ). En todos los casos se empleó el programa estadístico SPSS 12.0.

Los estudios realizados con animales de laboratorio fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de TOXIMED.

## **5.3 Resultados y discusión**

### **5.3.1 Estudios *in silico***

Después de determinada la secuencia de cada proteína (Anexo 7), se determinaron los péptidos que se acoplan a MHC - I (Epítotope T CD8<sup>+</sup>) y a MHC - II (Epítotope T CD4<sup>+</sup>) para humanos (Anexo 8). Luego se determinaron los sitios anatómicos de mimetismo molecular para cada proteína a través del programa FASTA. Como se puede apreciar en la tabla 5.2, para PorB se

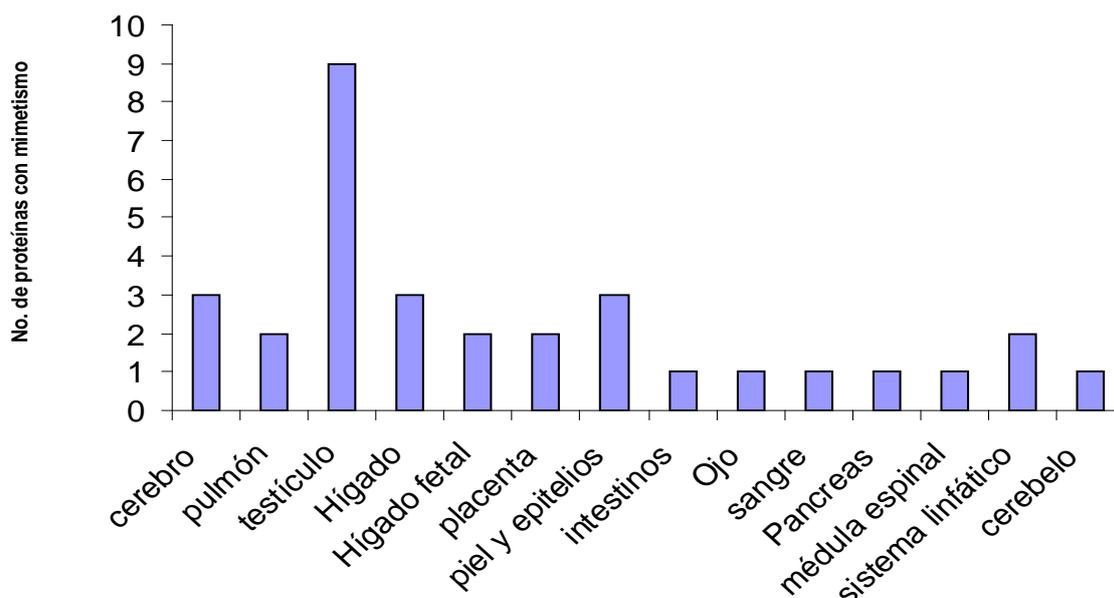
encontraron cuatro secuencias con mimetismo localizados en sangre, piel, testículos hígado fetal y adulto, en el caso de HmbR también se encontraron cuatro secuencias presentes en hígado fetal, placenta, pulmones, médula espinal, cerebro y testículos. La proteína FrpB tuvo la mayor cantidad de secuencias miméticas con 5 localizadas en intestinos, ovarios, páncreas, piel, testículos, ojos, piel, epitelios, cerebelo y sistema linfático. De todos estos órganos el testículo estuvo presente en cuatro de las 5 secuencias miméticas. Para el caso de la proteína OpA, presentó tres secuencias miméticas presentes en placenta, pulmones, ovarios, testículos y cerebro, mientras que OpC sólo presentó mimetismo en una proteína del sistema linfático.

. **Tabla 5. 2 Mimetismo entre proteínas humanas y proteínas de *N. meningitidis B***

<b>AFCo1 Proteínas</b>	<b>Nonámeros</b>	<b>Proteínas humanas con mimetismo</b>	<b>Localización tisular</b>
<b>PorB</b>	D L G N G L K A I	Integral membrane protein CII-3b	Sangre
	V A A M A D V T L	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma	Piel, testiculos, hígado fetal
	G I V D L G S K I	LFIRE 1	hígado
	L R V G R L N S V	PRO0907	hígado, testiculos
<b>HmbR</b>	T L R A G V Y N L	Peroxisomal trans-2-enoyl CoA reductase	hígado, hígado fetal , placenta
	Q L G G G R H R L	FBXL18 protein	Pulmones, testiculos cerebro, médula espinal, Corteza cerebral
	L L D D R Q F G V	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	testiculos
	S L G Y A K S K L	Asparaginase-like protein	intestinos, ovarios, páncreas, piel, testiculos
<b>FrpB</b>	K I R T N I V T L	Ras-related protein Rab-25	Ojos, piel, epitelios
	S L L S L T L A A	Treacle protein	Cerebelo
	H A A E N N A K V	Transmembrane protein 179	testiculos
	I L Y H Q G R F I	protein C2orf31	testiculos, sistema linfático
	A I I T K T V D A	NUAK family SNF1-like kinase 2	testiculos
<b>OpC</b>	A I I T K T V D A	Coiled-coil domain-containing protein 79	testiculos
	S I R E Y G L R V	IMAA protein	sistema linfático
<b>OpA</b>	S I R R L G L G V	Tripartite motif-containing protein 58	Placenta, Pulmones
	L G L G V V A G V	CDNA FLJ14836 fis, clone OVARC 1001702. My008 protein	Ovarios, testículos Cerebro

Fuente: Base de Datos FASTA, sitio: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/genomes.html>

Como puede apreciarse en la Fig 5.2 que muestra la frecuencia de localización de mimetismo molecular entre cinco proteínas mayoritarias de *N. meningitidis B* y proteoma humano, el testículo fue ampliamente el órgano que mayor frecuencia de mimetismo presentó en comparación con el resto de los órganos



**Figura 5.2 Frecuencia de localización de mimetismo molecular entre cinco proteínas mayoritarias de *N. meningitidis B* y proteoma humano**

Con este resultado, se determinó si el ratón también comparte epítopes miméticos en testículos utilizando la misma metodología anterior, pero considerando H2-Kd de ratón, cuyos resultados se muestran en la tabla 5.3. Como puede apreciarse, al igual que en humanos, las cuatro proteínas que dieron alta coincidencia de mimetismo molecular en testículos humanos, también coincidieron con mimetismo en testículos de ratón, siendo OpC, la única proteína de las cinco evaluadas que no mostró mimetismo molecular.

**Tabla 5.3 Proteínas testiculares (*Mus musculus*) conteniendo mimetismo molecular con cuatro proteínas mayores de AFCo1.**

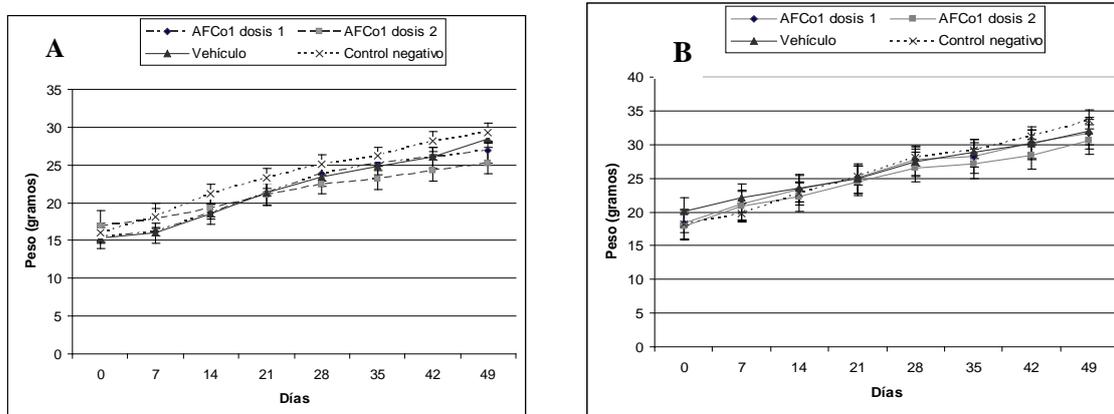
Proteínas de AFCo1	Nonámeros	Proteínas testiculares con mimetismo
<b>Por B</b>	S Y A H G F K G L	protein C7orf31 homolog (Protein TISP74)
<b>HmbR</b>	K Y H S F L G K I N F N S S R L S I D Y Y F S G R V V H R L S F K T F V	PIH1 domain-containing protein 1 1700012L04Rik protein Predicted (Novel protein similar to Histone H2A). Adult male testis cDNA, RIKEN fu Calicin Zinc finger protein 313
<b>FrpB</b>	A Y I E A I H E I	Adult male testis cDNA, RIKEN fu
<b>OpA</b>	A Y G H V R H S I	protein C7orf31

Fuente: Base de Datos FASTA, sitio: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/genomes.html>

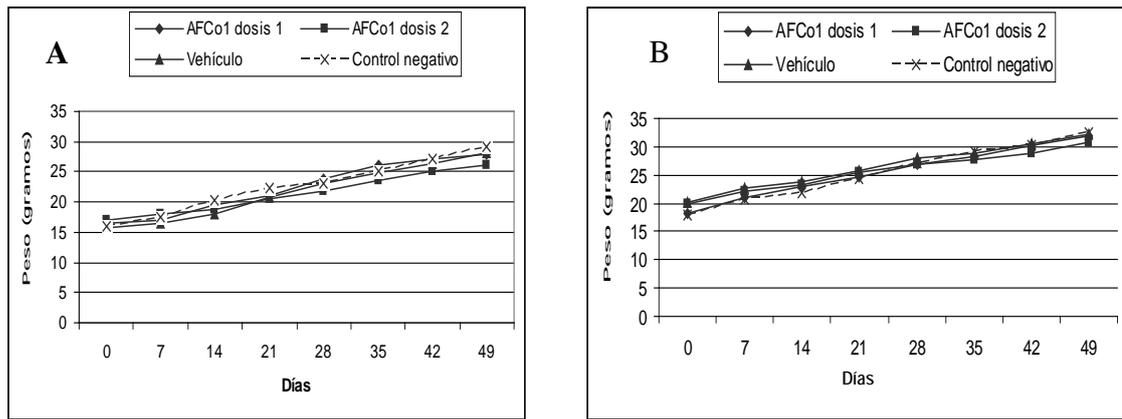
OpC no mostró secuencias miméticas con proteínas testiculares.

### 5.3.2 Estudios de toxicidad *in vivo*

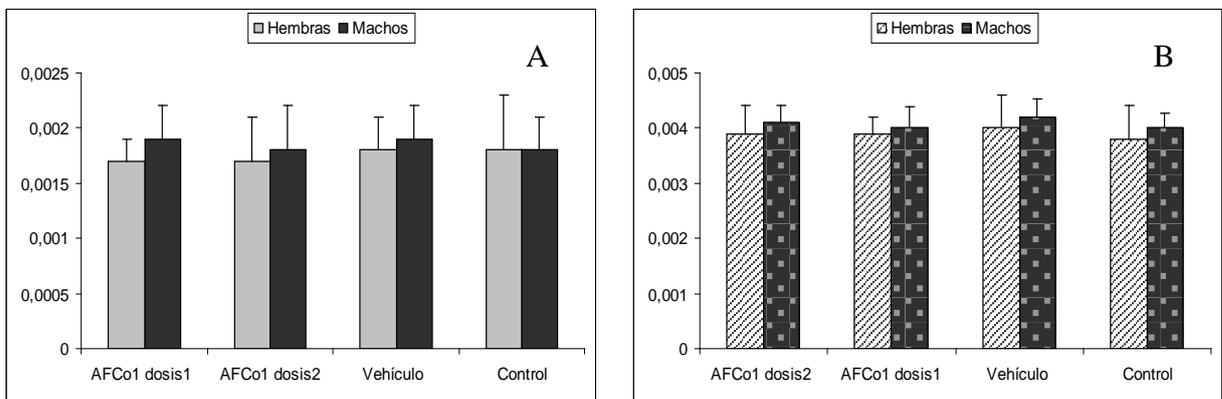
La evaluación de signos clínicos en los grupos de ratones no reveló la existencia de signos clínicos sugerentes de toxicidad general como: piloerección, movimientos anormales, piloerección, diarrea, secreción nasal, inflamación, entre otros. Además se registró un incremento sostenido del peso corporal de los animales tratados en cada experimento (Fig 5.3 – 5.4), la inexistencia de alteraciones en el peso relativo del timo y el bazo (Fig 5.5-5.6), así como en las variables hematológicas estudiadas (Tabla 5.4 - 5.5).



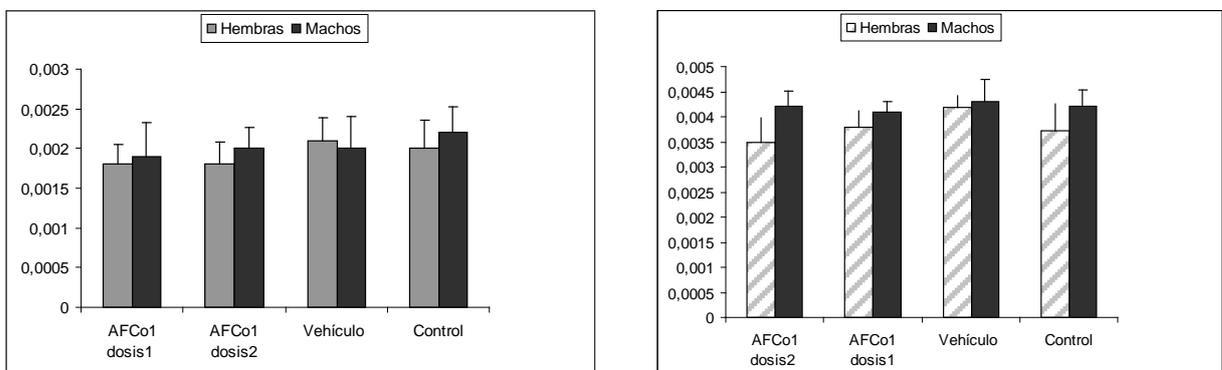
**Figura 5.3** Peso corporal semanal de grupos de ratones C57BL6 tratados durante 49 días de observación A) hembras, B) machos



**Figura 5.4** Peso corporal semanal de grupos de ratones DBA/2 tratados durante 49 días de observación **A) hembras, B) machos** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de las figuras 5.3 y 5.4 para cada tiempo de evaluación ( $P < 0.05$ ).



**Figura 5.5.** Peso relativo timo (A) y bazo (B) de los diferentes grupos de ratones C57BL6 tratados con AFCo1 a los 49 días de la primovacunación No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).



**Figura 5.6** Peso relativo timo (A) y bazo (B) de los diferentes grupos de ratones DBA tratados con AFCo1 a los 49 días de la primovacunación No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 5. 4 Parámetros hematológicos en sangre periférica de ratones C57BL6 machos tratados con AFCo1**

Grupos	Celularidad médula ósea x 10 <sup>5</sup> /ml	Conteo global de leucocitos x 10 <sup>9</sup> /L	Conteo absoluto poblaciones leucocitarias x 10 <sup>9</sup> /L		
			Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos
Vehículo	431 ± 67.2	9.01 ± 2.03	7.03 ± 2.2	1.52 ± 0.6	0.50 ± 0.3
AFCo1 dosis 1	399 ± 38.2	10.81 ± 2.65	8.36 ± 1.3*	1.97 ± 2.3	0.64 ± 0.4
AFCo1 dosis 2	401 ± 41.2	10.12 ± 1.94	8.82 ± 1.9*	2.42 ± 1.2	0.47 ± 0.12
Control negativo	357 ± 53.3	9.26 ± 2.08	6.28 ± 1.1	1.41 ± 0.9	0.36 ± 0.08

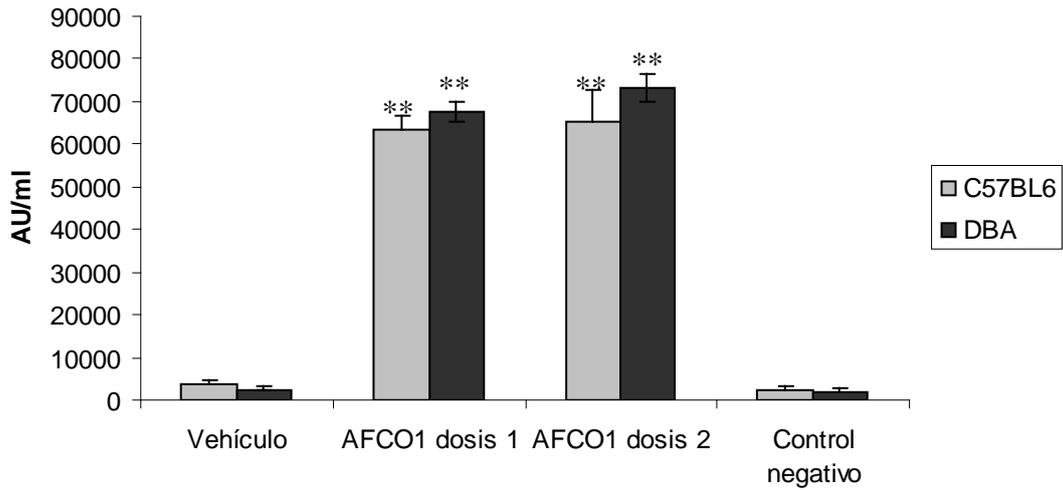
*\*Representa los grupos que difieren significativamente del grupo control negativo (P<0.05)*

**Tabla 5.5 Parámetros hematológicos en sangre periférica de ratones C57BL6 hembras tratados con AFCo1**

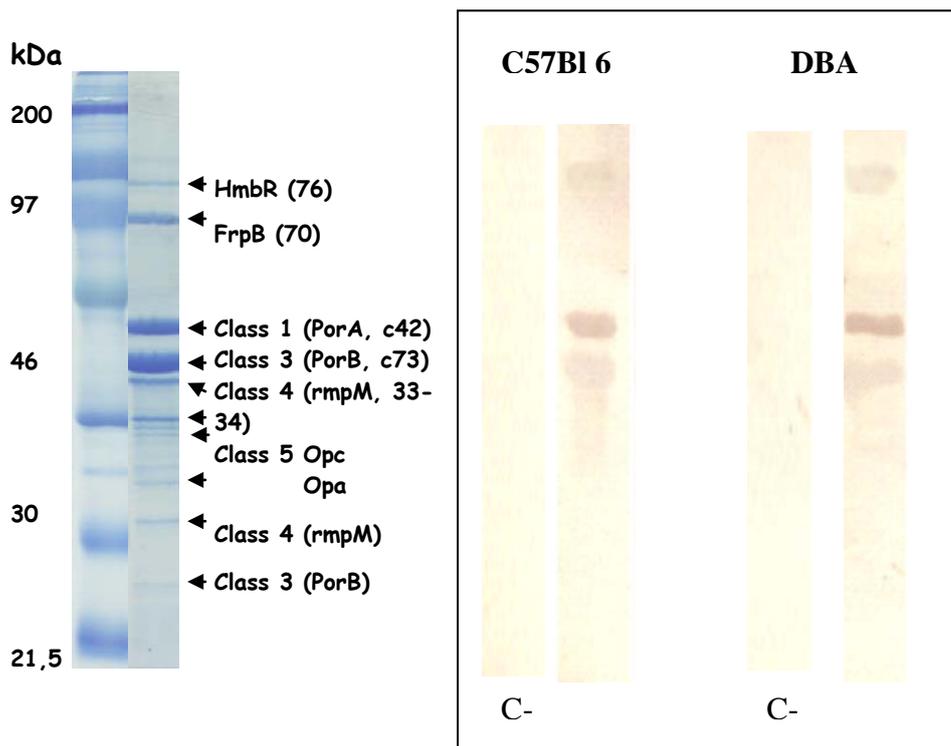
Grupos	Celularidad médula ósea x 10 <sup>5</sup> /ml	Conteo global de leucocitos x 10 <sup>9</sup> /L	Conteo absoluto poblaciones leucocitarias x 10 <sup>9</sup> /L		
			Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos
Vehículo	288 ± 59.2	7.01 ± 2.57	5.14 ± 1.1	2.01 ± 1.5	0.33 ± 0.4
AFCo1 dosis 1	306 ± 67.6	8.1 ± 1.07	7.24 ± 2.6*	3.33 ± 1.9	0.61 ± 0.6
AFCo1 dosis 2	351 ± 51.0	9.73 ± 2.26*	9.52 ± 3.2*	2.90 ± 1.4	0.44 ± 0.2
Control negativo	301 ± 73.4	7.22 ± 2.31	7.11 ± 2.3	2.05 ± 1.3	0.32 ± 0.8

*\*Representa los grupos que difieren significativamente del grupo control negativo (P<0.05)*

El estudio de la respuesta inmune contra estos antígenos mostró que hubo una significativa respuesta de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de AFCo1 en los animales inmunizados intranasalmente al ser evaluado por ELISA (Fig. 5.7), mientras que en la evaluación por inmunotransferencia, se comprobó la existencia de anticuerpos que reconocen las bandas correspondientes a las proteínas evaluadas (Fig 5.8).

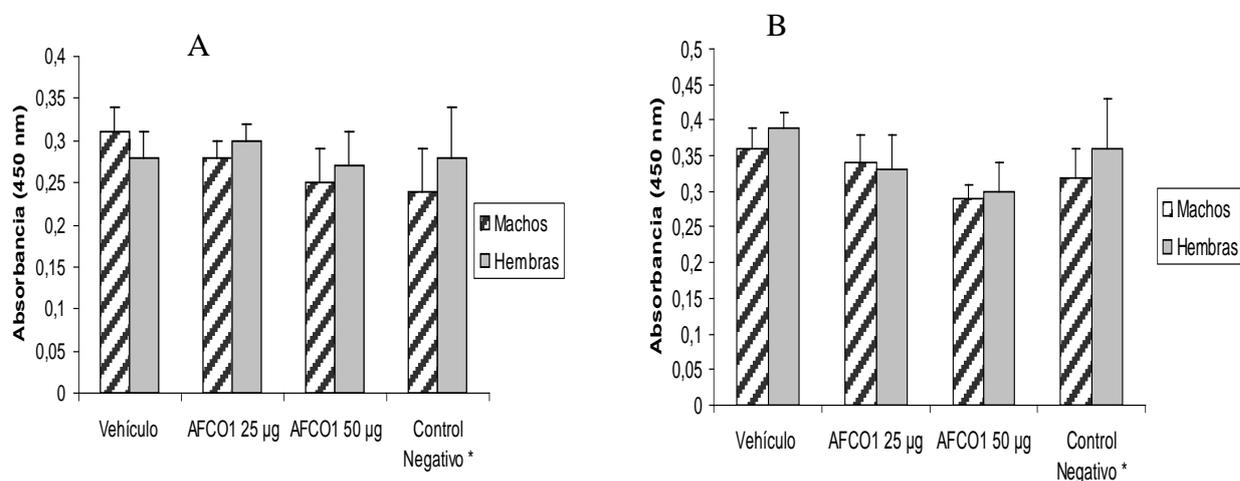


**Figura 5.7** Respuesta IgG específica en suero de ratones tratados con dos niveles de dosis de AFCo1 intranasal a los 49 días del estudio *\*\*Representa los grupos que difieren significativamente del grupo control negativo y el vehículo ( $P < 0.05$ )*



**Figura 5.8** Inmunotransferencia (panel derecho) de mezcla de suero de ratones C57Bl6 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.

El comportamiento de los anticuerpos anti-DNA en suero de ratones como indicador de posible efecto autoinmune no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los diseños empleados ni entre grupos para AFCo1 (Fig 5.9).



**Figura 5.9. Comportamiento de los anticuerpos anti-ADN en suero de ratones A) C57BL6 y B) DBA tratados con AFCo1** No se muestra la absorbancia del suero control positivo el cual presentó  $DO > 1.5$ . No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

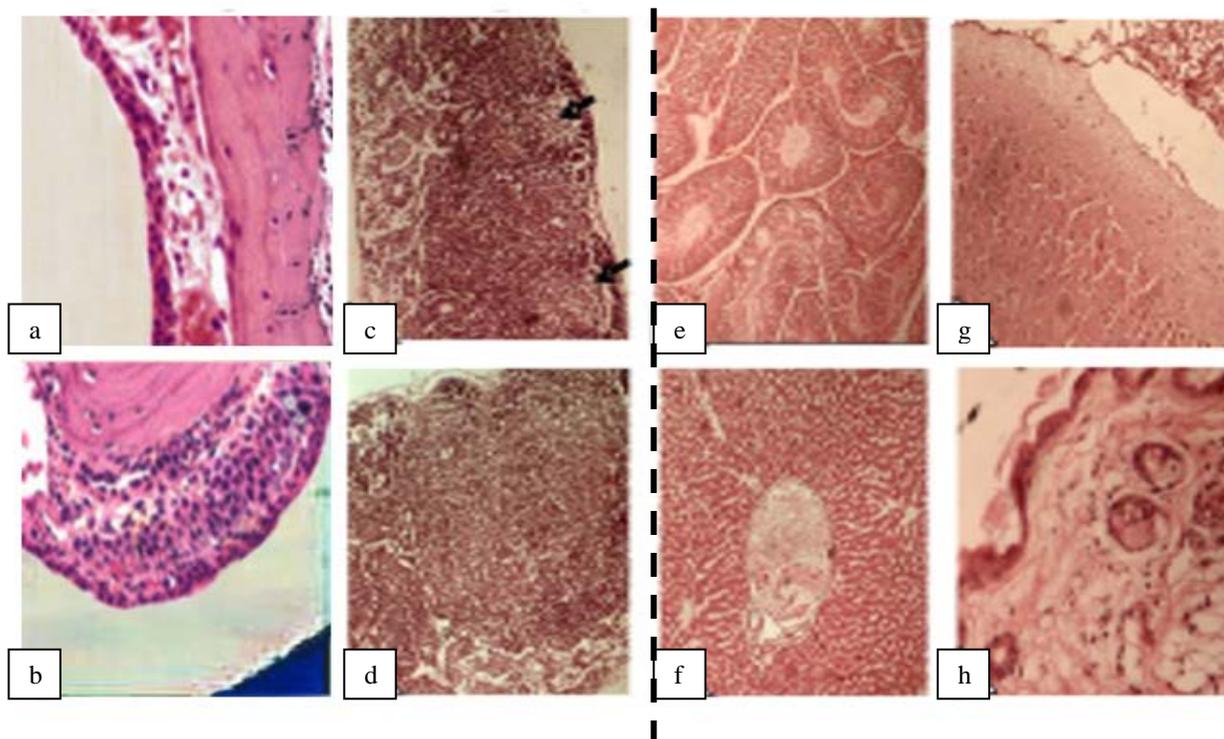
Desde el punto de vista bioquímico, no hubo alteraciones en dos de las principales enzimas que indican daño hepático como las ALT y la AST, tampoco se observaron elevaciones significativas de FA ni de LDH, ni en la glicemia, proteínas totales y urea como puede observarse en la tabla 5.6.

Finalmente, el análisis anatomopatológico tampoco evidenció daños morfológicos en ninguno de los grupos tratados para los productos AFCo1, excepto una ligera infiltración de células inflamatorias en la mucosa nasal, que es el sitio de inoculación de AFCo1, evidente a la mayor dosis, propio del efecto adyuvante de este producto. También se encontraron folículos secundarios en los linfonodos cervicales de los grupos tratados con AFCo1, lo cual se interpretó como normal para este tipo de producto y por la vía empleada (Fig. 5.10).

**Tabla 5.6. Parámetros bioquímicos en suero de ratones tratados con AFCo1 intranasal**

Parámetro	Grupos	C57BL6		DBA	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>ALAT</b> (U/L)	Vehículo	43.2±3.7	40.0±4.8	37.0±3.8	37.8±6.5
	AFCo1 Dosis1	39.8±5.9	36.6±5.02	41±4.1	36.6±3.9
	AFCo1 Dosis2	36.8±4.2	43±4.3	37.6±6.1	39.4±3.2
	Control negativo	37.6±5.5	44.2±5.5	36.6±7	38±9.1
<b>ASAT</b> (U/L)	Vehículo	114±15.7	116.6±12.4	122±17	121.6±12.4
	AFCo1 Dosis1	121.4±14.9	120.4±20.7	119.2±11.0	124.4±8.14
	AFCo1 Dosis2	124.4±9.9	116.2±17.8	119±16.8	119.2±18.3
	Control negativo	125.4±25.1	112.4±11.6	120.2±16.9	116.4±11.5
<b>FA</b> (U/L)	Vehículo	239.4±12.8	234.4±25.5	228.4±23	220.4±28.7
	AFCo1 Dosis1	218.4±25.8	214.4±42.4	224.6±31.3	216.6±13.5
	AFCo1 Dosis2	210.8±18.8	234.4±29.7	218.2±35	228±39.5
	Control negativo	218.4±54.6	211.8±15.0	212.8±31.4	217.8±41.4
<b>LDH</b> (U/L)	Vehículo	1639±45.3	1627.6±49.8	1645±44.3	1674.6±52.8
	AFCo1 Dosis1	1634.2±44.3	1643.8±74.4	1680±48.1	1639.6±54.26
	AFCo1 Dosis2	1660±58.8	1649.2±71.7	1671.8±56.8	1676.6±52.9
	Control negativo	1635.2±76	1620±71.64	1651.4±62.6	1639.8±62.2
<b>Glicemia</b> (Mmol/L)	Vehículo	4.9±0.8	4.8±0.8	5.3±1.3	5.0±1.6
	AFCo1 Dosis1	5.2±1.3	4.4±1.4	4.9±0.9	5.5±1.5
	AFCo1 Dosis2	5.5±1.5	5.2±1.5	5.9±1.6	5.3±1.8
	Control negativo	5.2±1.5	6.6±0.6	6.3±1.8	5.1±1
<b>Proteínas totales</b> (g/L)	Vehículo	56.6±7.3	61.6±8.2	61.4±6.6	60±6.5
	AFCo1 Dosis1	59.9±6.3	61.7±8.2	61.6±6.7	60.6±8.4
	AFCo1 Dosis2	61.4±6.8	63.1±6.6	64.3±6.5	64.2±5.8
	Control negativo	55.4±4.8	58.9±6.7	60.9±5.3	57.1±9
<b>Urea</b> (mmol/L)	Vehículo	6.2±0.5	7.0±0.3	6.5±1.1	6.8±1.1
	AFCo1 Dosis1	6.5±0.5	7.2±0.9	6.5±0.9	6.6±1.2
	AFCo1 Dosis2	6.3±1.4	6.4±0.8	6.8±1.2	7.0±0.9
	Control negativo	6.3±1.2	6.2±0.9	6.5±0.8	6.7±1.1

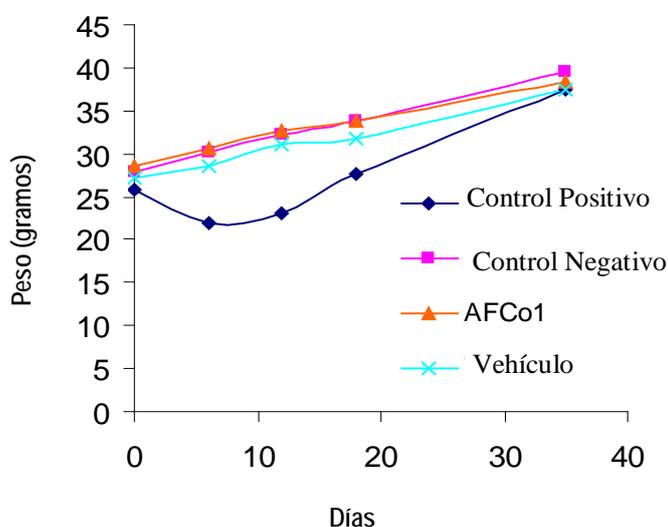
Los valores son expresados como la media ± desviación estándar. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados para cada variable bioquímica.



**Figura 5.10 Selección de microfotografías de los principales hallazgos histopatológicos en ratones C57BL6 tratados con AFCo1.** *Panel izquierdo:* A) Cavidad nasal de un ratón del grupo control no inmunizado, sin alteraciones. B) Infiltración ligera de células inflamatorias en la lámina propia de la mucosa a nivel de un cornete nasal proximal de la cavidad nasal, perteneciente a un ratón inoculado con AFCo1 dosis 2 C) Linfonodo cervical de ratón inoculado con AFCo1 dosis 2, se observan folículos linfoides secundarios. D) Linfonodo cervical del grupo control. *Panel derecho:* Órganos no linfoides con mimetismo molecular de los grupos de ratones tratados con AFCo1 dosis 2 E) testículo, F) hígado, G) cerebro, H) piel con aspecto normal. Similares resultados se obtuvieron para el resto de los grupos. Los cortes se colorearon con hematoxilina/eosina y se observaron en el microscopio a 100 ×

### 5. 3. 3 Toxicidad en células espermáticas del adyuvante AFCo1 por vía intranasal

Como puede apreciarse en la Figura 5.11, no ocurrió variación en el peso corporal de los grupos tratados con AFCo1 y su vehículo, ni en el control negativo durante todo el estudio. Sin embargo, en el grupo control positivo se observó una disminución del peso corporal progresivo hasta el décimo día, a partir del cual se incrementó de forma sostenida hasta el día 35 en que los cuatro grupos tuvieron pesos similares.



**Figura 5.11 Variación del peso corporal en ratones tratados con AFCo1 intranasal**

En la tabla 5.7, puede apreciarse que los grupos tratados con AFCo1 y su vehículo, así como en el control negativo, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides, en comparación con el control positivo el cual disminuyó a la mitad. Este resultado estuvo en concordancia con la frecuencia de anomalías espermáticas en los

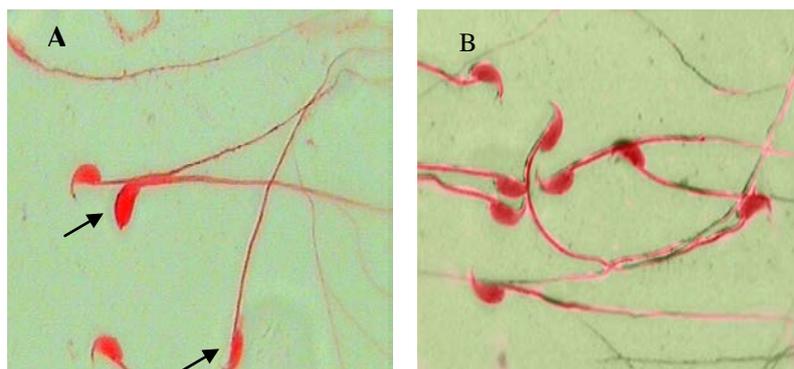
diferentes grupos tratados mostrado en la Tabla 5.8. El grupo control positivo presentó un incremento significativo en la frecuencia de anomalías morfológicas de la cabeza: sin gancho, banana y amorfo, por su parte el resto de los grupos tuvieron similar frecuencia dentro de límites normales como se muestra en la figura 5.12.

**Tabla 5.7. Densidad espermática en los diferentes grupos tratados**

Grupos experimentales	Dosis	Densidad espermática ( $10^6 \times \text{ml}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$
AFCo1	40 $\mu\text{g}$ en 40 $\mu\text{l}$	55.0 <sup>a</sup> $\pm$ 21.68
Vehículo	40 $\mu\text{l}$	52.7 <sup>a</sup> $\pm$ 20.72
Control Positivo	40 mg/kg	19.3 <sup>b</sup> $\pm$ 5.26
Control Negativo	1 ml/kg	40.4 <sup>a</sup> $\pm$ 23.13

**Tabla 5.8. Frecuencia de anomalías espermáticas en los diferentes grupos tratados**

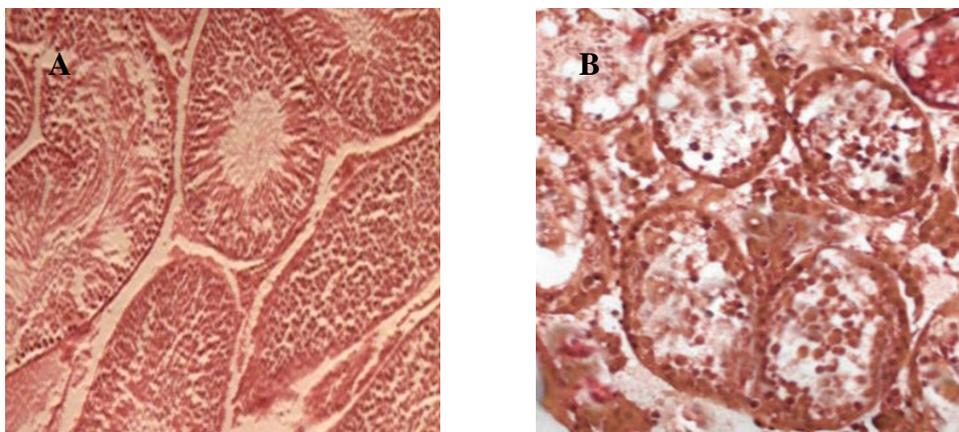
Grupos experimentales	Frecuencia de anomalías /1000 células $\bar{X} \pm \text{DE}$			
	Sin gancho	Banana	Amorfo	TA (%)
AFCo1	2.2 <sup>a</sup> $\pm$ 0.44	2.4 <sup>a</sup> $\pm$ 0.54	4.8 <sup>a</sup> $\pm$ 0.83	3.13
Vehículo	1.6 <sup>a</sup> $\pm$ 0.54	2.6 <sup>a</sup> $\pm$ 0.54	4.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.09	3.00
Control positivo	14.4 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	47.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.71	22.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.53	27.93
Control negativo	4.0 <sup>c</sup> $\pm$ 1.0	4.2 <sup>c</sup> $\pm$ 0.44	7.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.51	5.20



**Figura 5.12 Microfotografía de espermatozoides** A) anormales (flechas) del grupo control positivo tratado con ciclofosfamida B) normales en el grupo tratado con AFCo1 (Coloración eosina 1 % Aumento 1000x)

Finalmente, el estudio histopatológico de los testículos no mostró la presencia de anomalías en la arquitectura tisular ni signos de inflamación en los grupos tratados con AFCo1, vehículo y control, sin embargo en el grupo tratado con ciclofosfamida se detectaron daños testiculares con

baja densidad de células espermáticas y atrofia de túbulos seminíferos como se muestra en la figura 5.13 .



**Figura 5.13 Microfotografía de testículos** A) Normales en el grupo tratado con AFCo1 B) Disminución de la densidad de células espermáticas y atrofia de túbulos seminíferos. (control positivo tratado con ciclofosfamida). Coloración hematoxilina y eosina, Aumento 200x.

La determinación del mimetismo molecular utilizando herramientas bioinformáticas se propone como parte de los ensayos preclínicos toxicológicos de vacunas (Brennan y Dougan 2005.; Garçon, 2011). Esta propuesta se deriva del demostrado papel del mimetismo molecular como uno de los más importantes componentes del mosaico de autoinmunidad (Ryan, 2007). Los estudios de Fujinami y Oldstone inmunizando conejos con péptidos derivados de la polimerasa del virus de la hepatitis B que contiene una secuencia mimética con proteína básica de mielina, demostraron experimentalmente que es posible la ocurrencia de daños autoinmunes postvacunación (Anexo 3) (Fujinami y Oldstone, 1985). A pesar de esta demostración, y otros reportes experimentales de reacciones autoinmunes inducidas por la inoculación de péptidos miméticos, todavía no se conoce con exactitud su verdadero papel en la inducción de autoinmunidad postvacunal.

En este estudio se evaluó el mimetismo molecular secuencial (epítopes T) entre cinco proteínas mayores de *N. meningitidis* B y el proteoma humano. Estas proteínas están contenidas en AFCo1, así como en otras formulaciones adyuvantes derivadas de VME, y en VA-MENGOC-

BC. Los autores de AFCo1 han demostrado que durante la formación del cocleato se mantienen íntegras las proteicas originales de las VME de la bacteria y además que este adyuvante puede ubicarse en el citosol y los antígenos proteicos ser presentados por la vía MHC de clase I (Pérez y col., 2004; Pérez y col., 2006). La presentación de los péptidos exógenos, previamente endocitados y degradados por las CPA y posteriormente unidos a HLA-II, también es de gran importancia teniendo en cuenta que son reconocidos por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los que juegan un papel de vital importancia en la inducción y regulación de la respuesta inmune. (Akira, 2011) Para la predicción de epítopes T con el programa SYFPEITHI, se siguió la metodología indicada por sus autores (Rammense y col., 1997) y se obtuvieron los epítopes naturales más probables de las cinco proteínas de estudio. Debido a la gran heterogeneidad y diversidad de los HLA humanos, se realizó una selección de ellos basados en la alta frecuencia en la población cubana (Paradoa y col., 2000) y en otros países para los casos de HLA-A\* 0201 y HLA-DRB1\*01, (Rodríguez, 2007; Ossa y col., 2007), en tanto existen reportes de que el HLA-DRB1\*01 está asociado a fenómenos autoinmunes por adyuvantes (Guis y col., 2002, Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011; Gherardi, 2012).

La cantidad de nonámeros generados estuvo en dependencia de la cantidad de aminoácidos en cada una de las secuencias de trabajo. Por no contar con la información suficiente relacionada con la capacidad de inducción de fenómenos autoinmunes por parte de estas proteínas y para aumentar el valor predictivo se decidió llevar hasta diez los nonámeros correspondientes a las proteínas OpA, OpC y Por B, mientras que las proteínas HmbR y FrpB se llevaron hasta veinte nonámeros.

En nuestro estudio se detectaron similitudes secuenciales entre las proteínas estudiadas y otras presentes en diversos tejidos humanos. Sin embargo, de este resultado lo más significativo fue la alta frecuencia de mimetismo en proteínas testiculares superando en tres veces la frecuencia de los otros sitios. Debido a que la comprobación de la relevancia biológica del mimetismo

molecular se estudió en ratones, se confirmó también la existencia de alta frecuencia de mimetismo molecular en testículo de ratón evaluado para el H-2k murino.

A pesar del mimetismo molecular encontrado *in silico*, en el estudio de toxicidad *in vivo* realizado en dos líneas de ratones, y del desarrollo de una respuesta inmune contra las proteínas evaluadas evidenciada en las determinaciones de anticuerpos específicos por ELISA e inmunotransferencia, inmunizando con el AFCo1 intranasal, no se encontraron indicios de un fenómeno autoinmune en las variables clínicas, serológicas, bioquímicas y anatomopatológicas estudiadas. La ganancia de peso sostenida de los animales es un indicador de bienestar y buen estado de salud, generalmente cuando existen efectos tóxicos, los animales pierden apetito y e afectan otras funciones normales que inciden directamente en el peso, por lo que esta variable es muy utilizada en toxicología experimental (Duffus y col., 2009). El peso relativo del timo y bazo y las variables hematológicas se afectan con frecuencia cuando hay trastornos inmunotóxicos, así como algunas variables bioquímicas (Descotes, 2006), estas últimas tienen el valor adicional de que ayudan a interpretar otras posibles afectaciones que puedan estar contribuyendo al daño funcional además de la inmunotoxicidad (Duffus y col., 2009). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Infante en ratas, a las que se les administró el mismo producto y por la misma vía de administración, no se detectaron signos de toxicidad inducidos por este adyuvantes (Infante y col., 2009).

Teniendo en cuenta la alta frecuencia de mimetismo molecular encontrado en testículos tanto humanos como de ratón, se desarrolló un estudio específico de toxicidad espermática en una línea de ratón no consanguínea, la NMRI, la cual tiene un fondo genético más variable que las dos líneas empleadas en el estudio anterior. En este estudio se pudo observar que en ninguno de los grupos experimentales relacionados con la administración del adyuvante AFCo1 y su vehículo tuvieron signos clínico-patológicos de toxicidad testicular.

Las células germinativas masculinas a pesar de estar protegidas por la barrera hematotesticular (Filippini y col., 2001; Fijak y col., 2009) (Anexo 9), con frecuencia son afectadas por una variedad de agentes ambientales y fármacos que interfieren en el equilibrio existente entre supervivencia y apoptosis durante la espermatogénesis, generando en consecuencia no solo producciones reducidas de espermatozoides, (Tirado y col., 2003), sino también modificaciones tanto en las características morfológicas de las células espermáticas (Ichihara, 2007, Guzmán y col., 2005; Obidike y col., 2007, Krause, 2009). En el caso de las vacunas, se han reportado sospechas de asociación entre vacunación anti-parotiditis y orquitis, con un posible mecanismo autoinmune como base (Kuczyk y col., 1994; D´Souza y col., 2000, Clifford y col., 2010).

Además existen reportes de que bajo condiciones de potente inmunoestimulación puede haber una elevación de citocinas proinflamatorias y de una polarización hacia Th1 a nivel local, ocasionando una respuesta inflamatoria testicular que puede conllevar a destrucción de los espermatozoides o más raramente a una orquitis autoinmune (Filippini y col., 2001; Schuppe y Meinhardt, 2005.; Fijak y col., 2009). Esto sucede porque en testículos existe un ambiente antiinflamatorio predominante mediado por células T reguladoras y la testosterona (Fijak y col., 2009). Varios autores han podido inducir orquitis autoinmune experimental inmunizando ratas o ratones con homogenatos de testículos con adyuvantes o por transferencia de linfocitos T CD4+ de animales sensibilizados a animales no inmunizados (Zhou y col., 1989; Teuscher y col., 1994, Itoh y col., 1995; Schuppe y Meinhardt, 2005., Watanabe y col., 2005), incluso se ha detectado experimentalmente trastornos de la fertilidad por inmunización con pequeños péptidos (Xu y col 2010) o por vacunación a través de la vía oral y nasal (Liu y col., 2010), sugiriendo que los eventos autoinmunes inducidos en testículos son perfectamente posibles, aun sin el uso de adyuvantes (Itoh y col 1995),

En estos modelos murinos de orquitis autoinmune se han estudiado con profundidad los eventos inmunológicos que tienen lugar, evidenciándose la infiltración testicular con células dendríticas

(Rival y col., 2006; Guazzone, 2010), macrófagos (Rival y col., 2008) y diferentes poblaciones de linfocitos T que incluyen efectores Th1 y Th17, así como linfocitos T reguladores CD25 Foxp3+ (Tregs) (Naito e Itoh, 2008; Jacobo y col., 2010), y la liberación de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-17 y IL-23, capaces de desestabilizar el microambiente inmunosupresor testicular normal (Jacobo y col., 2010).

Todas estas evidencias clínicas y experimentales hacen que el estudio del efecto de las vacunas sobre la función reproductiva constituya un requerimiento en los estudios preclínicos antes de su utilización en humanos (Wise y col., 2010). En el caso de AFCo1, pudiera pensarse que al ser administrado por vía nasal, esta vía puede favorecer la polarización hacia Th2. Sin embargo, los estudios realizados por Pérez y colaboradores demuestran que este adyuvante y otros basados en proteoliposoma de *N. meningitidis* B, polarizan a Th1 a nivel sistémico (Pérez y col., 2006), lo cual podría tener alguna implicación a nivel testicular, sobre todo al encontrarse un incremento de la frecuencia de mimetismo molecular en testículos, tanto de humanos como de ratones, con un posible riesgo de daño testicular postvacunación. Sin embargo, a pesar de estos factores, el no haber encontrado evidencias de daño en este órgano en los animales vacunados, demuestra la seguridad del producto al ser administrado por vía nasal.

Por otro lado, el mimetismo molecular constituye un mecanismo que emplea *N. meningitidis* para escapar de la respuesta inmune (Lo y col., 2009). Uno de los mejores ejemplos lo constituye el mimetismo entre homopolímeros de ácido siálico capsulares del serogrupo B y un componente de NCAM (*del inglés: neural cell-adhesion molecule*), presente en el sistema nervioso, responsable de la pobre respuesta inmune generada contra la cápsula de este serogrupo, lo que ha dificultado la obtención de vacunas polisacáridicas contra este serogrupo. Así que, el mimetismo molecular a nivel de secuencias de aminoácidos también podría contribuir al éxito en la colonización e invasividad de *N. meningitidis* B (Lo, 2009; Hill, 2010).

Otras formulaciones vacunales como VA-MENGOC-BC, la cual se ha utilizado en millones de personas, incluyendo varones en los que no se ha detectado trastornos de la fertilidad en los estudios de farmacovigilancia realizados (Ochoa y col., 2010), es otra evidencia de que a pesar de existir mimetismo molecular entre proteínas testiculares y proteínas de *N. meningitidis B*, no hay un incremento del riesgo de infertilidad masculina post vacunación.

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.

## **CAPÍTULO 6. BIOMODELO CINETICO PARA LA EVALUACION DEL EFECTO DE LA INMUNOESTIMULACION POR ADYUVANTES SOBRE LA CONCENTRACION SERICA DE TEOFILINA**

### **6.1 Introducción**

Una de las manifestaciones inmunotóxicas sistémicas de los compuestos inmunoestimulantes es la inhibición de las enzimas del sistema citocromo CYP, con la afectación de la biotransformación de fármacos y sustancias químicas que se metabolizan por esta vía para su eliminación, como lo demostró Renton en pacientes asmáticos vacunados contra influenza, quienes sufrieron los efectos de la teofilina administrada en las primeras horas de la vacunación (Renton y col., 1980). La posterior demostración de que las citocinas proinflamatorias están involucradas en la inhibición de las enzimas CYP, ha estimulado las investigaciones del efecto de la inflamación sobre el metabolismo de medicamentos (Bleau y col., 2003, Projean y col 2005, 2007). Sin embargo, a pesar de este conocimiento, existen muy pocas investigaciones sobre el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes y la interacción con fármacos de uso común en la práctica clínica, lo cual pudiera tener grandes implicaciones en los estudios de farmacovigilancia.

La teofilina es un medicamento con efecto broncodilatador, ampliamente utilizada en pacientes que se encuentran en crisis de asma bronquial y otras afecciones respiratorias (Sweetman, 2009). Se metaboliza por la vía de la CYP por lo que una inhibición de estas enzimas producto a la inmunoestimulación puede acarrear un incremento de sus concentraciones plasmáticas y de la toxicidad (Yang y col., 2008). En este capítulo se describe el efecto de los adyuvantes de Freund's por vía subcutánea y el AFO1 por vía nasal sobre la concentración plasmática de teofilina en ratas Sprague-Dawley, con el objetivo de evaluar la utilidad de este modelo en ensayos preclínicos adicionales de inmunotoxicidad de adyuvantes

## 6.2 Materiales y métodos

**6.2.1 Animales:** Ratas macho Sprague-Dawley suministradas por CENPALAB de 6–8 semanas de peso y entre 265–325 g. Los animales se mantuvieron en el vivario de TOXIMED en ambiente controlado, alimentación a base de ratonina suministrada y certificada por CENPALAB y agua *ad libitum*. Los estudios realizados cumplieron con las regulaciones éticas, así como las Buenas Prácticas de laboratorio establecidas en TOXIMED.

**6.2.2 Adyuvantes:** Adyuvante Completo de Freund (AFC) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (Difco, USA). En ambos casos se utilizó una emulsión preparada con solución salina fisiológica al 0.9 % en proporción v/v y mezclada durante 15 minutos en agitador Vortex.

AFCo1: Cocleato derivado del proteoliposoma de *N. meningitidis B*, en el Instituto Finlay, obtenido bajo condiciones estandarizadas ((Pérez y col., 2008).

### 6.2.3 Niveles de dosis, frecuencia y duración de la administración

**Tabla 6.1 Diseño del estudio de efecto de la inmunización con AFCo1 sobre la concentración sérica de teofilina en ratas Sprague Dawley**

	Grupos Experimentales n (10 ratas x grupo)	Productos	Niveles de Dosis	Días	Aplicación de teofilina vía i.p*	Evaluación**
1	Control	Vehículo Tris-Ca	20 µl x fosa nasal	0, 5, 10, 19	5 mg x kg IP	24 horas
2	Control Positivo	ACF/AIF SC	100 µl/dosis	0, 14	5 mg x kg vía IP	24 horas
3	Experimental 1	AFCo1	50 µg/dosis en 20 µl x fn	0, 5, 10, 19	5 mg x kg vía IP	24 horas
4	Experimental 2	AFCo1	100 µg/dosis en 20 µl x fn	0, 5, 10, 19	5 mg x kg vía IP	24 horas

\* Luego de la administración de teofilina

\*\* Se refiere a las 24 horas de la última administración de adyuvantes

**6.2.4 Administración de teofilina:** A estas cuatro variantes se le aplicó teofilina a razón de 5 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal, 24 horas después de la última dosis de adyuvantes.

**6.2.5 Observación y registro de signos clínicos:** Se registró durante todo el estudio la existencia de signos clínicos de toxicidad como comportamiento anormal, piloerección, diarrea, taquipnea, secesión nasal, hipersecreción salival u otro signo de toxicidad a la teofilina. También se registró el peso corporal de cada rata al inicio y al final del experimento.

**6.2.6 Toma de muestras:** Se tomó muestra de sangre por vía retrorbital a dos ratas por cada tiempo y por grupo para la cuantificación de teofilina, al tiempo 0 (antes de la administración), al finalizar la administración, a los 30, 60, 120, y 240 minutos. Se emplearon dos ratas por grupo y para cada tiempo. También se determinaron los niveles de ALAT, ASAT, Glicemia, colesterol, triglicéridos, urea y creatinina, para evaluar el estado general de la función metabólica y en especial el estado de la función hepática y renal. De igual forma se determinó la inducción de respuesta inmune IgG anti.-VME por ELISA. Una vez terminado el sangrado las ratas se sacrificaron por dislocación cervical.

Las muestras de sangre una vez coaguladas se centrifugaron y las alícuotas de 100 µl de cada muestra de suero se conservaron a -70°C, hasta su evaluación para la cuantificación de teofilina y determinaciones bioquímicas e inmunológicas.

**6.2.7 Necropsia:** Se examinaron todos los órganos en especial el sitio de inoculación de la región subcutánea en el grupo tratado con ACF y se tomaron muestras para procesamiento histológico de la cavidad nasal en los grupos tratados con AFCo1 y subcutáneo a nivel del sitio de inoculación para el grupo con adyuvantes de Freund.

**6.2.8 Determinación de la concentración plasmática de teofilina:** La concentración de teofilina en muestras de suero de rata se determinó por Cromatografía Líquida de Alta Precisión

(HPLC) por el método de Kamakatsu modificado (Yang y col., 2008). Con los puntos obtenidos se confeccionó una curva de concentración/tiempo y se determinó el Area Bajo la Curva (ABC) por medio del programa Origin 70, así como el pico de concentración máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo de vida media.

**6.2.9 ELISA anti IgG específica:** La técnica de ELISA se realizó en placas de 96 pozos de alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc, EUA) que se cubrieron con una solución de 20  $\mu\text{g/mL}$  de proteoliposoma de *N. meningitidis B* diluido en solución tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  11 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM (pH 9,6). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato 0,15 M (pH 7.2) (SSTF). Luego de bloquear con solución de bloqueo (seroalbúmina bovina (SAB) al 1% (p/v) en SSTF) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,4).

El suero de referencia y los sueros a evaluar se diluyeron 1:200 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v). Se aplicó 100  $\mu\text{L}$ /pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia. Las placas se incubaron a 37 °C por 2 horas, luego se lavaron cuatro veces con SSTF. Se adicionó 100  $\mu\text{L}$ /pozo de anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20, 0,1% (v/v), durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda.

Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con solución de lavado, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de una solución de peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno ortho-fenilendiamina (OPD) 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus).

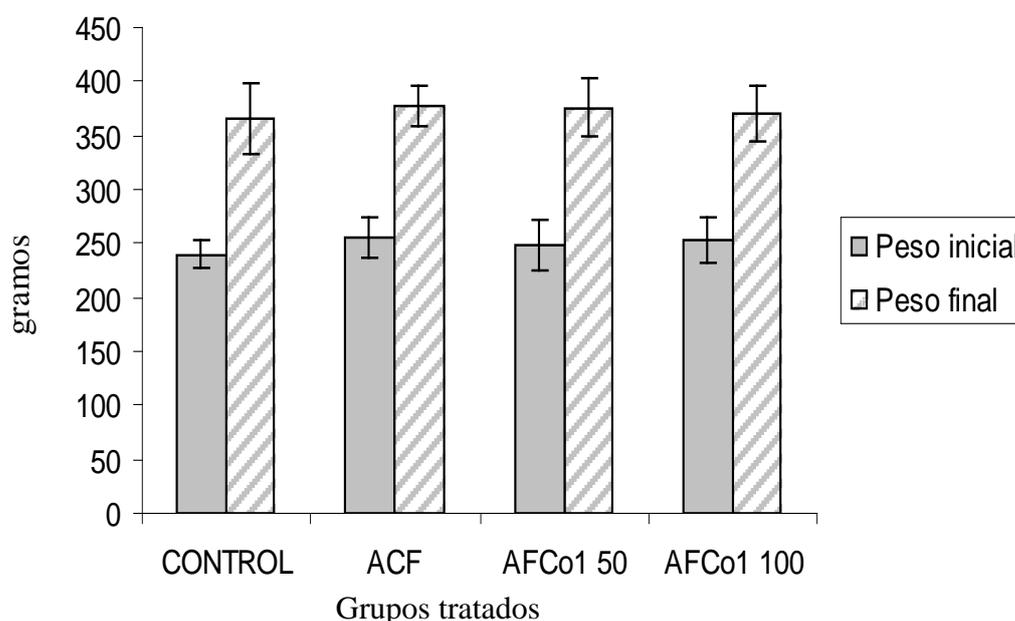
### 6.2.10 Cuantificación de ALT, AST, Glicemia, Colesterol Triglicéridos, Urea y Creatinina.

Se realizó a través de un analizador automático Hitachi con kit específicos (Roche).

**6.2.11 Análisis estadístico:** Todos los datos son expresados como la media  $\pm$  S.D. La comparación entre grupos se llevó a cabo por un análisis de la varianza de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. Las diferencias entre grupos fueron significativas si  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete Statgraphics Plus 5.1.

## 6.3 Resultados y discusión

El ensayo se realizó en ratas machos por tener mayor corpulencia y volemia. Todos los animales tratados con adyuvantes no mostraron cambios significativos en el peso corporal inicial y final en comparación con el grupo control negativo. (Fig. 6.1).

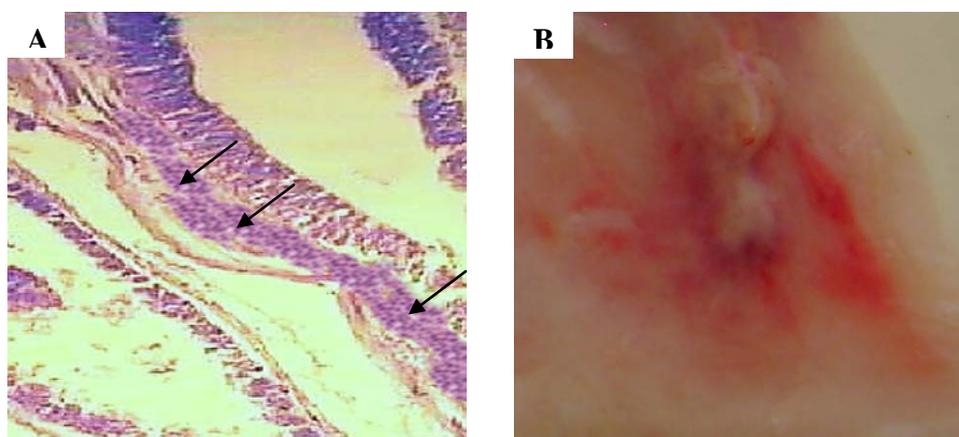


**Figura 6.1 Pesos inicial y final en ratas Sprague Dawley tratadas con AFCo1 intranasal**

*No hubo diferencias significativas entre los grupos para los pesos iniciales y finales, pero si se registró dentro de cada grupo diferencias significativas entre los pesos iniciales y finales ( $P < 0.05$ ).*

Todos los animales tratados con ACF mostraron incremento de la frecuencia respiratoria, cinco de ellos mostraron diarrea pastosa y dos piloerección, una vez administrada la teofilina, lo cual se detectó a partir de la primera hora de aplicado el broncodilatador. Las ratas del resto de los grupos no mostraron signos de toxicidad.

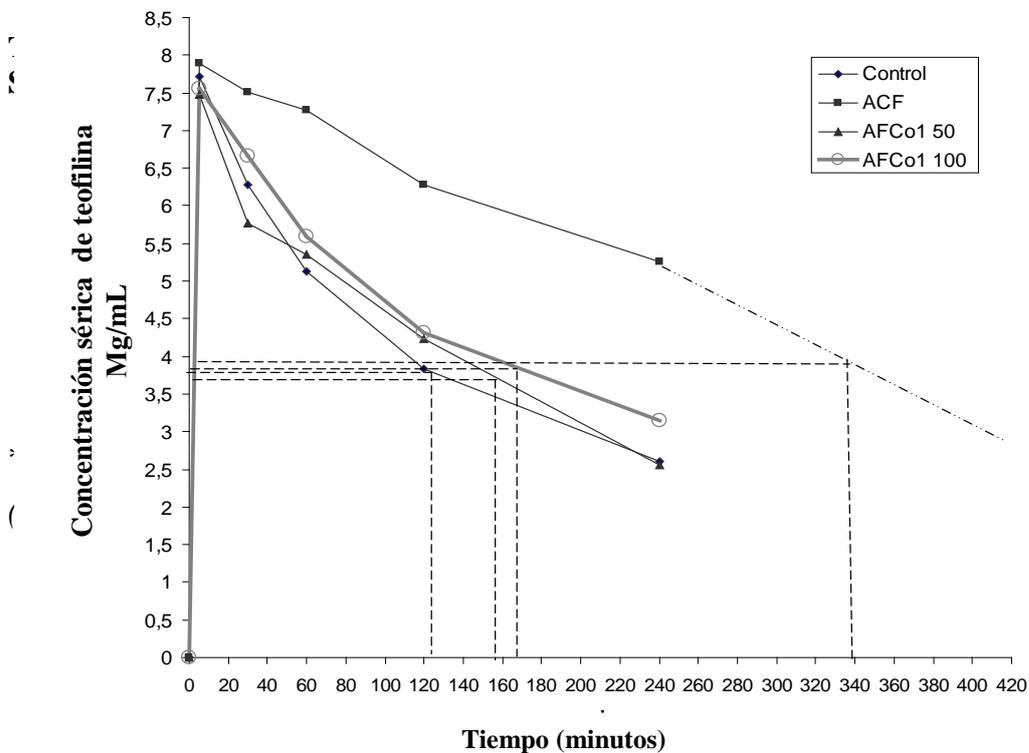
En el sitio de inoculación de los adyuvantes se detectó en el caso del AFCo1 una ligera infiltración de células inflamatorias en la submucosa de la cavidad nasal propio del efecto adyuvante del AFCo1, mientras que el grupo con adyuvantes de Freund, se evidenció una severa reacción local con granulomas y hemorragias (Fig 6.2)



**Figura 6.2 Reacciones locales en el sitio de administración:** A) *Reacción inflamatoria ligera (flechas) en la lámina propia en un cornete de la región posterior de la cavidad nasal en una rata tratada con 100 µg/dosis de AFCo1 intranasal (hematoxilina & eosina, 100 x).* B) *Reacción inflamatoria severa en el tejido subcutáneo en la región dorsal superior, con granuloma y hemorragia en una rata del grupo control tratado con ACF (4x).*

Como se muestra en las tabla 6.2 y la figura 6.3, al evaluar la concentración de teofilina durante 240 minutos (4 horas), se detectó que la concentración sérica máxima de teofilina se comportó de manera similar en los cuatro grupos a los 5 minutos. Sin embargo, a partir de los 30 minutos y hasta el ultimo tiempo evaluado, el grupo que recibió adyuvantes de Freund desarrolló una elevación sostenida de la concentración de teofilina en sangre en relación con el resto de los

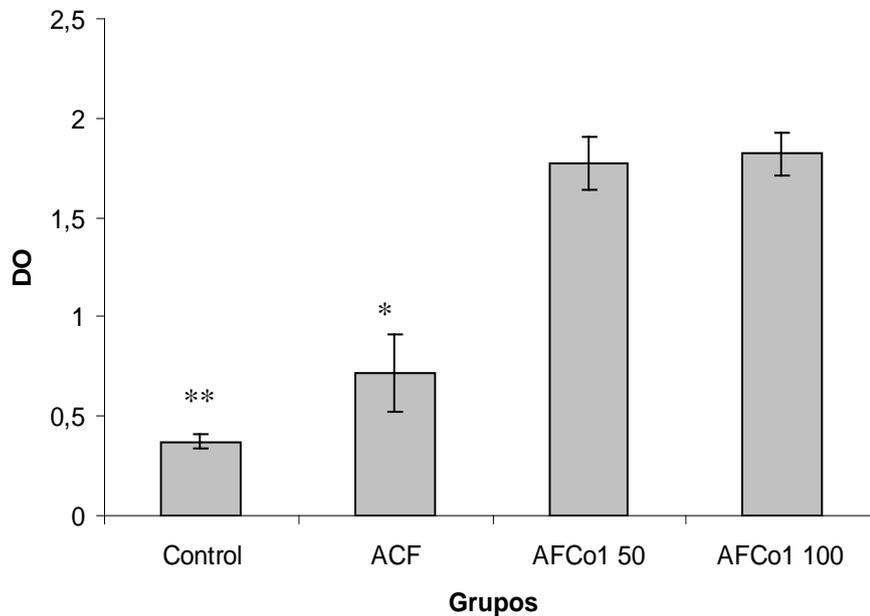
grupos, elevando el TVM a 338 minutos, en comparación con el grupo control negativo y los grupos de AFCo1 50 y AFCo1 100, que fueron de 123, 156 y 176 respectivamente.



**Figura 6.3 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.*

Aunque el tiempo de vida media de la teofilina de los grupos tratados con AFCo1 fue ligeramente superior al grupo control negativo, esta diferencia no fue significativa. De igual modo el ABC, fue muy superior en el grupo tratado con ACF en relación con el grupo control y tratados con AFCo1 intranasal.

El comportamiento de la respuesta de IgG anti proteoliposoma en suero se muestra en la figura 4, donde se evidencia una elevación de estos anticuerpos en ambos grupos tratados con AFCo1 intranasal, así como en menor proporción en el grupo tratado con adyuvantes de Freund.



**Figura 6.4 Efectos de la inmunización con AFCo1 intranasal sobre la respuesta de IgG anti proteoliposoma en suero de ratas.** *Hubo diferencias significativas entre las densidades ópticas (DO) del grupo control y el resto de los grupos, así como entre el grupo tratado con ACF y el resto de los grupos. 1 ( $P < 0.05$ ).*

En la tabla 6.3 se muestra que no hubo cambios significativos en las variables bioquímicas estudiadas al comparar los grupos entre sí, lo que indica que no se desarrollaron cambios metabólicos, ni afectaciones en las renales y hepáticas que pudieran justificar un aumento de la concentración plasmática de teofilina por trastornos en la excreción, este último aspecto lo indica los valores normales de urea y creatinina (Ozzer y col., 2008; Duffus, 2009)

**Tabla 6.3 Efectos de la inmunización sobre parámetros bioquímicos en ratas Sprague Dawley tratadas con AFCo1 intranasal y teofilina.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valores normales</b>	<b>Grupos</b>	<b>Valores registrados</b>
<b>ALT</b> (U/L)	36-67 U/L	Control	45.29 ± 9.7
		ACF	41.34 ± 15.4
		AFCO1 50	45.83 ± 14.9
		AFCO1 100	54.78 ± 15.3
<b>AST</b> (U/L)	102-145 U/L	Control	130.62 ± 29.2
		ACF	133.54 ± 42.1
		AFCO1 50	126.90 ± 41.5
		AFCO1 100	131.93 ± 25.1
<b>Glicemia</b> (mmol/L)	2.3-7	Control	3.37 ± 1.6
		ACF	3.56 ± 1.6
		AFCO1 50	5.33 ± 2
		AFCO1 100	5.95 ± 0.85
<b>Colesterol</b> (mmol/L)	1.4-2.6	Control	1.17 ± 0.6
		ACF	1.35 ± 0.7
		AFCO1 50	1.93 ± 0.9
		AFCO1 100	1.77 ± 0.4
<b>Triglicéridos</b> (mmol/L)	0.5-2.2	Control	2.04 ± 0.5
		ACF	2.18 ± 0.4
		AFCO1 50	2.09 ± 0.3
		AFCO1 100	1.66 ± 0.6
<b>Urea</b> (mmol/L)	5.3-8.2	Control	6.3±1.2
		ACF	7.4±2.1
		AFCO1 50	5.1±2.6
		AFCO1 100	6.8±1.5
<b>Creatinina</b> (umol/l)	41.6-66.6	Control	60.2±2.2
		ACF	65.7±3.1
		AFCO1 50	59.8±2.8
		AFCO1 100	63.6±2.1

*Los parámetros bioquímicos evaluados, no mostraron cambios estadísticamente significativos en los grupos evaluados.*

El biomodelo utilizado puede considerarse un método alternativo ya que cumple con el principio de la reducción del dolor y sufrimiento animal (Refinamiento) (Balls, 2009). Los modelos convencionales que se emplean para estudios preclínicos farmacocinéticos contemplan la canalización de venas y arterias, manteniendo al animal por largas horas en un cepo, mientras

se le administra el medicamento a evaluar; esto conlleva a un sufrimiento prolongado de los animales de laboratorio (Gordon, 1994). En este caso, se empleó la inoculación de teofilina por vía intraperitoneal y luego la toma de muestras de dos ratas por grupo en cada tiempo, lo cual reduce considerablemente la manipulación de los animales y el estrés por dolor y por restricción del movimiento, ya que mientras no se les toma la muestra ellos permanecen libres en su caja. Se considera que la administración intraperitoneal es prácticamente equivalente a la endovenosa, lográndose una absorción casi inmediata del producto (Gordon, 1994).

Se eligió la teofilina como modelo de medicamento ya que además de los reportes existentes de incremento de su toxicidad postvacunación (Renton, 1980), es un broncodilatador utilizado para el tratamiento del asma y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que tiene un margen terapéutico estrecho, lo que propicia la aparición de reacciones adversas cuando los niveles sanguíneos se elevan, por ejemplo, cuando existen dificultades con su metabolismo y eliminación en pacientes con enfermedades hepáticas, cardíacas y renales (Sweetman, 2009). Este medicamento se metaboliza por la vía de la CYP en el hígado, específicamente 1A1/2, 2B1/2, y 3A1/2 en ratas Sprague-Dawley y se ha empleado como un modelo para evaluar el efecto de compuestos inmunomoduladores sobre el metabolismo de fármacos por esta vía (Yang y col., 2008).

En este trabajo se evaluaron los efectos de la administración de dos adyuvantes, sobre los niveles de teofilina en suero, inmediatamente y durante las primeras horas postvacunación, empleando un modelo cinético en ratas Sprague-Dawley. Se incluyeron en el estudio los adyuvantes de Freund como adyuvante de referencia que produce una respuesta inflamatoria intensa en el sitio de inoculación asociada a una potente disminución de las enzimas CYP hepáticas, sobre todo a las 24 horas de la administración del adyuvante (Projean y col., 2005). También se incluyó el AFCo1, como adyuvante experimental que se utiliza por vía intranasal (Pérez y col., 2006).

Nuestros resultados evidenciaron que como era de esperar en el grupo tratado con adyuvantes de Freund, la concentración sérica de teofilina tuvo una mayor persistencia, dada por el TVM y el ABC, en comparación con los grupos a los que se les administró AFCo1 intranasal, los cuales no mostraron cambios significativos en la concentración sérica de este medicamento en comparación con el grupo control negativo. De igual modo, clínicamente se evidenció aumento de la frecuencia respiratoria, presencia de diarrea y piloerección en varios animales del grupo tratado con adyuvantes de Freund, como evidencia de toxicidad a la teofilina (Sweetman, 2009). Todos estos cambios estuvieron asociados a una intensa respuesta inflamatoria local en el sitio de inoculación en ese grupo a diferencia del resto de los grupos, como expresión de que la inflamación local pudo estar involucrada en la toxicidad a la teofilina.

Por otro lado, en los grupos tratados con AFCo1 a dos niveles de dosis, no se observó una elevación significativa de las concentraciones de teofilina sérica en comparación con el grupo de los adyuvantes de Freund, aunque en estos grupos los tiempos de vida media de este fármaco fueron ligeramente superiores en relación al grupo no tratado, en especial el grupo de mayor dosis, lo cual puede obedecer a que en la región nasal se observó una ligera respuesta inflamatoria, aunque mucho menor que la del grupo con adyuvantes de Freund. Esta ligera respuesta inflamatoria a nivel nasal inducida por AFCo1 fue también descrita por Infante y colaboradores y no obedece a un efecto irritante directo del producto, sino a la propia actividad adyuvante del cocleato (Infante y col., 2009). También se observó que los grupos tratados con AFCo1 desarrollaron una significativa respuesta específica contra el proteoliposoma de *N. meningitidis B.* y sorpresivamente también se observó una elevación de esta respuesta en los grupos tratados con ACF, aunque mucho menor, lo cual pudiera ser debido a algún antígeno presente en las Micobacterias que comparte similitud con algún componente del meningococo generando una reactividad cruzada.

En este estudio no se evaluó la actividad de la CYP, pero ya se ha demostrado ampliamente el efecto de la inflamación y las citocinas proinflamatorias sobre la inhibición de la actividad de estas enzimas, (Renton, 2000; Bleau y col., 2003; Projean y col., 2005, Yang y col., 2008), por lo que nuestra hipótesis es que este resultado puede obedecer a una posible inhibición de estas enzimas asociadas a la respuesta inflamatoria local inducida por el adyuvante. En este sentido se requieren nuevos estudios para confirmar este planteamiento.

Las variables bioquímicas estudiadas no revelaron cambios significativos en los grupos estudiados. De especial interés resultó el comportamiento normal de las enzimas transaminasas cuya elevación puede revelar la presencia de daño hepático (Ozer y col., 2008), así como la urea y la creatinina que cuando se incrementan, expresan trastornos a nivel renal (Duffus, 2009). La normalidad de estas variables expresa que el comportamiento de la concentración de teofilina en sangre no estuvo influido por trastornos en estos órganos.

No obstante hay que considerar que el análisis de estos efectos es muy complejo ya que una misma citocina o mediador inflamatorio puede ejercer efectos antagónicos, según sea la isoenzima sobre la que actúe y la concentración a la que desarrolle su acción. Es por esto de vital importancia conocer la naturaleza de las reacciones inflamatorias para determinar las repercusiones sobre la actividad y expresión de CYP. Por ejemplo, Bleau y colaboradores demostraron, mediante el uso de cultivos primarios de hepatocitos, que la CYP3A6 es más vulnerable que la CYP1A1 y CYP1A2 a un reto inflamatorio provocado por una infección en humanos y una reacción inflamatoria en conejos (Bleau y col., 2003).

Para agregarle mayor complejidad al fenómeno, se ha reportado la existencia de variaciones interindividual en la misma especie en cuanto a la respuesta moduladora en las enzimas CYP, lo que causa respuestas metabólicas diferentes ante un mismo agente (Smith y coll., 1999; Galli y Feijoo, 2002). Sin embargo, la complejidad de estos procesos no significa que estos fenómenos sean ignorados, pues al contrario, ellos pueden explicar numerosas reacciones adversas que

aparecen en la clínica y que hoy no son adecuadamente diagnosticadas ni comprendidas (Renton, 2000; Galli y Feijoo, 2002),

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.

## **CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL**

La evaluación preclínica de adyuvantes vacunales constituye hoy un reto, principalmente por la gran variedad de candidatos existentes con disímiles estructuras y composiciones, el conocimiento incompleto de los mecanismos de acción y de toxicidad, así como la falta de métodos y modelos validados para su evaluación (Mora y col., 2006; Leitner, 2012). Esta situación hace que a pesar de existir una guía reguladora específica para adyuvantes que trata de dar indicaciones generales (EMEA 2005), el consenso actual es que los ensayos se realicen caso a caso atendiendo al tipo de adyuvante, la vía de administración y el mecanismo de acción propuesto, lo cual permitirá recopilar información de utilidad para la toma de decisiones (Brennan y Dougan, 2005; Sutkowski y Gruber, 2006; Mora, 2007; Wolf y col., 2010; Garçon, 2011). Tomando en consideración este criterio, se han propuesto algunas alternativas de evaluación (Brennan y Dougan, 2005; Leitner 2012) y otros autores han publicado sus experiencias de cómo lograron obtener el registro sanitario de sus productos adyuvantes (O'Hagan, 2007; Leroux-Roels 2009; Garçon, 2011), lo cual puede servir de guía para otras formulaciones similares.

Uno de los aspectos que deben ser profundamente evaluados en los estudios preclínicos de adyuvantes es la inmunotoxicidad, ya que el sistema inmune es el blanco primario de estos productos (EMEA 2005), sin embargo, en este caso el reto es mayor, ya que a diferencia de los ensayos inmunotoxicológicos para evaluar efecto inmunosupresor, los cuales están muy bien validados (Dean y col., 1996), los ensayos para evaluar efectos tóxicos como consecuencia de la inmunoestimulación no han tenido el mismo desarrollo (Descotes, 2000, 2006; Dieter, 2010).

Para el inicio de este trabajo fue necesario aplicar a los adyuvantes la clasificación vigente de los tipos de inmunotoxicidad (Descotes, 2004), ya que en los trabajos precedentes se relacionaban los efectos locales y sistémicos de los adyuvantes (Gupta y col., 1993, Simon y

Edelman, 2006), pero sin un orden establecido que permitiera diseñar estudios basados en los tipos y mecanismos de inmunotoxicidad.

La aplicación de esta clasificación de inmunotoxicidad a los adyuvantes puso en evidencia que, lejos de ser raras (Brennan y Dougan, 2005) o estar circunscritas a las respuestas de hipersensibilidad y autoinmunidad (Verdier, 2001; Brennan y Dougan, 2005), las manifestaciones inmunotóxicas de los adyuvantes cubren casi la totalidad de los reportes de toxicidad de las vacunas adyuvadas, pues también incluyen: el síndrome pseudogripal o respuesta de fase aguda, la afectación del metabolismo de xenobióticos (fármacos y sustancias químicas), el síndrome de escape vascular y las consecuencias de la inmunoestimulación en el desarrollo pre y postnatal.

Otro aspecto novedoso en este análisis inicial fue definir que la evaluación del efecto irritante local puede integrar los ensayos de inmunotoxicidad, ya que basado en la teoría del peligro (Matzinger, 1994), la lisis celular conlleva a la liberación de moléculas endógenas capaces de estimular la respuesta inflamatoria local, lo cual es de gran importancia en la toxicología de los adyuvantes (Marrack y col., 2009). Por otro lado, en muchos trabajos se recomienda el uso de herramientas bioinformáticas para la detección de mimetismo molecular entre antígenos vacunales y humanos para detectar el riesgo de autoinmunidad (Brennan y Dougan, 2005; Garçon, 2011), pero no existen reportes de la utilidad de esa predicción a nivel preclínico. De igual modo, aunque se conoce que durante eventos donde se desarrolla una respuesta inflamatoria se afecta la biotransformación de diversos fármacos (Renton, 2001), incluso este efecto se reportó después de aplicar una vacuna (Renton, 1985); este interesante fenómeno, aunque ha sido estudiado en algunos modelos de inflamación inducida por adyuvantes (Projean y col., 2006; Yang y col., 2008a,b), nunca se ha evaluado como parte de los estudios toxicológicos de adyuvantes.

Basado en estos análisis y con la premisa de que existe una urgente necesidad de desarrollar nuevos métodos de evaluación preclínica de adyuvantes (Brennan y Dougan, 2005; Harandi y col., 2010), se decidió evaluar el uso de tres métodos alternativos que permitan mejorar el estudio preclínico inmunotóxico de adyuvantes vacunales. Los ensayos propuestos fueron: el HET-CAM para estudiar el efecto irritante directo, como inductor de inmunotoxicidad local, así como su inserción en un estudio preclínico de eficacia-toxicidad; estudios bioinformáticos como complemento a los ensayos de predicción del potencial de inducción de autoinmunidad y su valor pronóstico a nivel preclínico; y un modelo cinético de teofilina en suero, para evaluar el efecto de la inmunostimulación en la cinética de medicamentos que se metabolizan a través de las enzimas CYP. Los resultados obtenidos pueden ser una primera etapa que permita una ulterior validación de estos métodos para su uso en ensayos toxicológicos adaptados a los adyuvantes que lo requieran, como parte de los estudios caso a caso (Verdier 2002; Wolf y col., 2010).

En este trabajo se utiliza por primera vez el HET-CAM para evaluar irritabilidad inmediata y directa de los adyuvantes vacunales. Anteriormente Beck y colaboradores lo habían reportado como método alternativo para estudiar la respuesta inflamatoria inducida por una vacuna adyuvada (Beck y col., 2003). Al estudiar un grupo de siete adyuvantes por HET-CAM y por el método de tolerancia local *in vivo*, se pudo evidenciar que aquellos adyuvantes que produjeron una irritación local en el *in vitro*, también produjeron una potente reacción local *in vivo*, mientras que los que no resultaron ser irritantes, sólo causaron una discreta reacción local, o no produjeron reacción visible. Al analizar estadísticamente el resultado se observó una correspondencia entre ambos métodos en este estudio, sin embargo al aplicar técnicas estadísticas más refinadas y cuantitativas, se evidenció que la correspondencia no es absoluta y esto se explica porque hay otros mecanismos, además de la irritación, que determinan la

migración de células inmunocompetentes hacia el sitio de inoculación, y que contribuyen también a la inmunotoxicidad local (Schijns, 2006; Wilson, 2010).

Este resultado aporta evidencias a favor de que el HET-CAM puede ser utilizado como un método de pesquisaje de toxicidad de adyuvantes y formulaciones vacunales en etapas tempranas de desarrollo, antes del inicio de estudios más costosos y complejos. De particular interés resulta su potencial utilidad para el estudio de adyuvantes que se aplicarán por vía nasal, teniendo en cuenta que los modelos animales utilizados en estas pruebas, tienen grandes diferencias en la estructura de la cavidad nasal lo que dificulta la interpretación y extrapolación a los seres humanos (Harkema, 1990; Gizurarzon, 1990; Pereira y col., 2011).

En el capítulo 4 se evidencia el uso potencial del HET-CAM para evaluar el efecto irritante de una vacuna experimental veterinaria contra la fiebre aftosa, conteniendo un adyuvante en estudio denominado Cliptox, formulado con el VFA inactivado como parte de un ensayo preclínico que evalúa el balance eficacia-toxicidad de esta formulación. Los datos del efecto no irritante obtenidos por HET-CAM con la formulación Clptox-VFAi, permitieron dar continuidad al estudio y se corroboró *in vivo* la no toxicidad local de este producto.

Este resultado también sirvió como evidencia de que no siempre se requiere que el adyuvante sea tóxico a nivel local para alcanzar un adecuado efecto adyuvante, como plantea la teoría del peligro (Matzinger, 1994) y como expresó Paul, que “*la toxicidad es inherente al efecto adyuvante*”, (Intervención del profesor William Paul en un Simposio Internacional de Potenciación de la respuesta Inmune a Vacunas) (referido en: Edelman 1980 y col., Gupta y col., 1993). En la actualidad existen varios reportes de adyuvantes que no producen una reacción local de consideración, manteniendo su capacidad inmunopotenciadora (Batista y col., 2000; Silva y col., 2004; Petrovski 2008; Infante y col., 2009, Waghmare y col., 2009; Calabro y col., 2011; Garçon, 2011).

En un estudio reciente se evaluó la cinética del antígeno en el sitio de inoculación con el adyuvante hidróxido de aluminio y se pudo demostrar que la retención del antígeno en el sitio de inoculación tampoco es necesaria para lograr una adecuada inmunopotenciación por un adyuvante (Noe y col., 2010). De igual modo, hay reportes de que en el caso de MF59, uno de los adyuvantes licenciados para uso en humanos, se produce una depuración temprana de la formulación antígeno-adyuvante en el sitio de inoculación por medio de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, sin un efecto de depósito, permitiendo una rápida ubicación del antígeno en los ganglios linfáticos, lográndose una adecuada inmunopotenciación (Tritto y col., 2009, Calabro y col., 2011). Todo esto junto a nuestros resultados evidencia que la asociación toxicidad local-efecto adyuvante, no es un dogma (Petrovski, 2008). De modo que la inserción del HET-CAM demostrando el efecto irritante o no de un adyuvante en estudio, puede ser de utilidad para la toma de decisiones en estudios posteriores. Como método alternativo responde a 2 de las 3Rs que distingue a estos métodos (Balls, 2009); en este caso, el Reemplazamiento y la Reducción del número de animales en los estudios toxicológicos. Estos resultados estimulan la realización de nuevas investigaciones que permitan validar este método alternativo *in vitro* como herramienta potencial para el pesquiasaje entre diferentes formulaciones adyuvantes antes de los estudios *in vivo*.

Los estudios *in silico* han encontrado un espacio importante y creciente como herramienta para el diseño y evaluación de candidatos vacunales (De Groot y col., 2001; Gupta y col., 2010, Poland, 2010a). Los algoritmos que permiten, partiendo de las secuencias proteicas primarias, obtener epítopes T para determinadas moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad y a partir de ahí identificar regiones de mimetismo molecular entre estas proteínas presentes en vacunas y estructuras propias, ofrecen una oportunidad inigualable para detectar, al menos teóricamente, posibles sitios de desarrollo de fenómenos de naturaleza autoimmune (Brennan y

Dougan 2005; Garçon, 2011), por esta razón, el segundo método alternativo propuesto para ampliar lo estudios preclínicos de adyuvantes y vacunas adyuvadas es la bioinformática, también denominado estudios *in silico*, para la detección de mimetismo molecular.

El mimetismo molecular constituye hoy uno de los pilares en los que se sustenta la teoría de la autoinmunidad post-infección (Wucherpfennig, 2001; Bogdanos y col., 2005, 2006; Ryan y col., 2007; Rose, 2010) o post vacunación (Fujinami y Oldstone, 1985; Waisbren, 2008). Incluso se ha intentado aprovechar para el diseño de vacunas contra afecciones autoinmunes (Root-Bernstein, 2007). Hoy se conoce que el mimetismo conformacional entre estructuras microbianas y humanas es una causa del fracaso de vacunas (Granoff y col., 2001; Hill y col., 2010) o de inducción de respuestas autoinmunes post-infección (Rose, 2010). Sin embargo, para el caso de los epítopes T, aún se desconoce su verdadero papel en la inducción de respuestas autoinmunes cuando están presentes en antígenos vacunales, lo que ha generado un interés particular en este tema (Rao y col., 1999; Ghillerme y Kalil, 2002; Ryan y col., 2007).

Por otra parte, se ha planteado que la eliminación de epítopes miméticos podría contribuir a eliminar el riesgo de autoinmunidad y aumentar la eficacia de una vacuna, pudiendo ser una estrategia para el diseño de formulaciones más efectivas y seguras (Liu y col., 2006), aunque Bogdanos plantea que esta estrategia no siempre es efectiva para eliminar el riesgo de autoinmunidad (Bogdanos, 2006), lo cual genera mayor controversia en este aspecto y estimula a profundizar en estas investigaciones.

El estudio de mimetismo molecular en formulaciones vacunales tiene al menos dos utilidades: determinar teóricamente sitios de riesgo de autoinmunidad o alternativamente buscar respuestas sobre posibilidades de fallos o de una pobre inmunogenicidad de candidatos vacunales debido a los mecanismos de tolerancia existente, lo que ocasionaría fracasos en la respuesta protectora (Granoff y col., 2001). En el caso de *N. meningitidis B*, se ha estimulado la búsqueda de epítopes T a través de la bioinformática para el diseño de vacunas antimeningocócicas, tratando de evitar

regiones con mimetismo molecular potencialmente peligrosas. (Chandra y col., 2009; Gil y col., 2009; Gupta, 2010).

En el capítulo 5, se partió de un estudio *in silico* para detectar mimetismo molecular entre epítopes T provenientes de antígenos mayores de *N. meningitidis B* y el proteoma humano, y posteriormente evaluar *in vivo* la posibilidad de inducir un efecto autoinmune psovacunal en dos líneas de ratones luego de la inmunización intranasal con AFCo1, adyuvante que conserva los mismos antígenos proteicos de la VME de *N. meningitidis B*. Este ensayo constituye un ejemplo de la aplicación del mapeo de antígenos en estudios preclínicos inmunotoxicológicos (Saint-Remy, 1997).

En el estudio *in silico* realizado, aunque hubo numerosas epítopes T miméticos entre las proteínas presentes en AFCo1 y el proteoma humano, particularmente en testículo, lo cual fue también confirmado en ratones, en los estudios toxicológicos realizados en ratones C57BL6 y DBA/2 bajo nuestras condiciones experimentales, no se constató la existencia de una respuesta inflamatoria en los tejidos portando proteínas miméticas, ni la elevación de biomarcadores de autoinmunidad como los anticuerpos anti ADN, que hiciera sospechar una reacción autoinmune organoespecífica o sistémica, a pesar de haberse inducido una respuesta inmune contra las proteínas evaluadas contenidos en AFCo1, como se evidenció tanto por ELISA como por inmunotransferencia. El hallazgo de alta frecuencia de mimetismo en testículos motivó a realizar un estudio más particularizado de toxicidad de AFCo1 en el sistema reproductor masculino, empleando en esta ocasión el NMRI, un modelo de ratón no consanguíneo que se usa como biomodelo para estos fines. En este estudio tampoco hubo evidencias de daño testicular en las células espermáticas en nuestras condiciones experimentales. En otro ensayo toxicológico realizado por Infante y colaboradores a AFCo1 en ratas, tampoco se evidenció daños en testículos ni en otros órganos (Infante y col., 2009), confirmando nuestros resultados.

Aunque en este estudio de mimetismo molecular realizado a antígenos proteicos de AFCo1 no se detectaron signos de toxicidad o respuesta autoinmune subclínica en los ensayos toxicológicos realizados, es necesario señalar que en otros estudios donde se ha encontrado mimetismo molecular para otras vacunas, como por ejemplo, el reportado por Fujinami y Oldstone para una vacuna de hepatitis B y PBM (Fujinami y Oldstone, 1985), si hubo una respuesta autoinmune en el sistema nervioso a nivel experimental.

Con estos resultados y los análisis realizados se evidencia que los estudios de mimetismo molecular por medio de herramientas bioinformáticas, si bien ofrece una información importante para sustentar un estudio de posible riesgo de autoinmunidad, su alcance a nivel preclínico resulta limitado desde el punto de vista predictivo, debido a la existencia de tolerancia inmune, a la rareza de estos efectos, lo cual es imposible observar en ensayos con pocos animales y de corta duración, la influencia del factor genético que impide que podamos contar siempre con líneas animales susceptibles, así como la carencia de biomarcadores suficientemente validados para la predicción de autoinmunidad a nivel preclínico. Algunos de estos problemas en los ensayos preclínicos de autoinmunidad fueron analizados por Dieter y col. (Dieter y col., 2010) y constituyen hoy un reto para las investigaciones en vacunas.

Por esa razón la determinación de mimetismo molecular puede tener una mayor importancia como información complementaria para los estudios más avanzados de farmacovigilancia, donde intervienen miles de personas inmunizadas con un abanico genético poblacional más amplio. A pesar de sus limitaciones, hoy los estudios bioinformáticos están en la vanguardia de la nueva era de las vacunas, basadas en diseños racionales con una predicción minuciosa del balance eficacia toxicidad (Poland, 2010).

El tercer método propuesto para ampliar los ensayos de inmunotoxicidad de adyuvantes es un biomodelo cinético de teofilina en suero, empleado en ratas Sprague-Dawley. Un modelo que según su diseño cumple con los requisitos de los métodos alternativos (Balls, 2009), ya que

reduce considerablemente el sufrimiento animal, si lo comparamos con los modelos convencionales para ensayos farmacocinéticos (Gordon, 1994; Yang y col., 2008), pues en el modelo utilizado se realiza la inoculación intraperitoneal en vez de endovenosa profunda (la cual tiene implícito una canalización quirúrgica de una arteria y una vena profunda por largas horas); la toma de muestra es retroorbital, ampliamente aceptada en ensayos toxicológicos; el animal no está restringido en su movimiento y solo se le hace una extracción de muestra de sangre, tal y como se describió en el capítulo. Con estas modificaciones los resultados de la farmacocinética de la teofilina en los animales controles sin inmunizar fueron similares a los obtenidos por Yang empleando un modelo convencional (Yang y col., 2008).

La propuesta de este modelo en evaluaciones preclínicas inmunotoxicológicas de adyuvantes se justifica por los reportes existentes de que durante procesos inflamatorios e infecciosos agudos o crónicos, se desarrollan reacciones adversas a determinados medicamentos, especialmente la teofilina, que se metabolizan por la vía de las enzimas CYP, debido al demostrado efecto inhibitorio que sobre estas enzimas tienen las citocinas proinflamatorias. (Descotes y col., 1985; Vial y Descotes, 1994; Renton 2000, 2001).

A pesar de este conocimiento no existen reportes de este tipo de investigaciones preclínicas o clínicas de vacunas que estén en fase de desarrollo, aunque si de muy pocos adyuvantes e inmunomoduladores como: el ACF (Projean y col., 2007), lipopolisacáridos de *Klebsiella pneumoniae* (Yang y col., 2008b), entre otros (Barakat y col., 2001; Yang y col., 2008a), pero no con fines de evaluación de un producto, sino para demostrar el efecto de la inflamación y la infección en el metabolismo de fármacos. Este nuevo enfoque del uso de un biomodelo cinético de un fármaco como parte de un ensayo toxicológico de adyuvantes, dota a este trabajo de novedad científica.

Los estudios realizados al ACF (Stewart-Tull, 1995; Sai-Kiang, 2003) y al candidato a adyuvante AFCo1 (Pérez y col., 2006) han demostrado que ambos inducen respuestas del tipo

Th1, sin embargo, ACF es un poderoso inductor de citocinas proinflamatorias que inhiben las enzimas CYP hepáticas (Projean y col., 2005, 2007), en tanto AFCo1 solo produce ligeros incrementos de citocinas como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ . Los resultados obtenidos en el comportamiento de los niveles de teofilina en sangre, están en correspondencia con lo que se esperaba, es decir que ACF produjera un retardo en la eliminación de la teofilina con incremento de su toxicidad, mientras que AFCo1 intranasal no afectara significativamente los niveles de este medicamento en sangre, como indicador de que esta ocurriendo normalmente su biotransformación hepática, por lo que los resultados encontrados en este biomodelo concuerdan con la actividad inmunoestimuladora reportada de estos adyuvantes (Stewart-Tull, 1995; Sai-Kiang Lim, 2003; Projean y col., 2007; Pérez y col., 2007). No obstante este modelo puede ser perfeccionado, ya que en estos experimentos no se determinó la actividad de la CYP hepáticas en los animales tratados. La inclusión de esta variable en los estudios futuros puede aportar sustanciales evidencias de la inhibición de estas enzimas como mecanismo directo de la afectación de la biotransformación de la teofilina, o de otro medicamento con similares características que pueda ser utilizado.

De modo que aunque este tipo de ensayos preclínicos no se utilizan hoy y aun se requieren otros estudios para perfeccionar y validar este biomodelo propuesto, los resultados iniciales obtenidos en este trabajo, evidencian su utilidad potencial para futuros ensayos de inmunotoxicidad de adyuvantes en desarrollo, específicamente para investigar el riesgo de incremento de la toxicidad de fármacos como la teofilina, debido a la inmunoestimulación. Un ejemplo en que pudiera interesar este tipo de estudios es durante la fase de evaluación preclínica de una vacuna adyuvada terapéutica contra el asma bronquial.

Finalmente, las vacunas han tenido y tienen un considerable impacto en la salud mundial y aunque se han reportado sospechas de asociaciones raras con eventos adversos considerados graves, muchas veces asociados a una predisposición genética (Poland, 2010), o a la búsqueda

minuciosa de eventos que a veces no están relacionados directamente con la vacuna (Jacobsen y col., 2012), el balance riesgo-beneficio apunta a que hay que continuar desarrollando esta tecnología (O'Hagan y Rappuoli, 2004). Hoy se han logrado importantes avances en la introducción de vacunas de nueva generación, sin embargo aún el otorgamiento de licencias sanitarias de nuevos adyuvantes eficaces y seguros en vacunas humanas profilácticas, ha sido más lento y requiere de un mayor esfuerzo para el diseño racional basado en los últimos avances en inmunología básica, así como la introducción de nuevas herramientas de evaluación. Los resultados alcanzados en este trabajo contribuyen a avanzar en este camino.

## CONCLUSIONES

1. Se demostró que el método *in vitro* HET-CAM puede ser de utilidad para la evaluación del efecto irritante directo de adyuvantes vacunales.
2. Se demostró que el HET-CAM puede ser utilizado desde etapas iniciales, como parte de los ensayos de eficacia-toxicidad de adyuvantes vacunales que se encuentran en fase experimental.
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 fue limitado en el modelo empleado.
4. Se demostró la utilidad del modelo cinético de teofilina sérica para evaluar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre medicamentos que se metabolizan a través de CYP.

## RECOMENDACIONES

1. Extender a otros adyuvantes la evaluación del efecto irritante por HET-CAM y realizar la validación del método para este uso.
2. Incorporar el HET-CAM como parte de los estudios de eficacia-toxicidad de otros adyuvantes para confirmar su utilidad durante estos ensayos preclínicos.
3. Extender los métodos bioinformáticos a la determinación del mimetismo molecular conformacional (epitopes B) y proteínas propias y evaluar su relevancia toxicológica a nivel preclínico.
4. Incorporar al modelo cinético de la teofilina otras variables como: la evaluación a nivel de las enzimas CYP y la cuantificación de citocinas, así como extender el uso de este modelo a otros adyuvantes, incluyendo el hidróxido de aluminio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Akira, S. 2011 Innate immunity and adjuvants. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366, 2748–2755.
2. Alving, CR., Peachman. KK., Rao, M., Reed SG. 2012., Adjuvants for human vaccines. *Curr Op Immunol*, 24:310–315.
3. Anderson, AC., Anderson DE., 2006. TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 18:665–669.
4. Baluna, R., Vitetta, E.S., 1997. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 37, 117-132.
5. Baluna, R Cytokine-Induced Vascular Leak Syndrome. In: House RV; Descotes J., ed 2007. *Cytokines in Human Health: Immunotoxicology, Pathology and Therapeutic Applications*. Humana Press.
6. Baldrick, P.; Richardson, D. and Wheeler, A. W. 2002. Safety evaluation of a glutaraldehyde modified tyrosine adsorbed house dust mite extract containing monophosphoryl lipid A (MPL®) adjuvant: a new allergy vaccine for dust mite allergy. *Vaccine* 20, 737-743.
7. Balls, M. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1995, 9:871-929.
8. Balls, M., 2009. Animal experimentation and the three Rs: past, present and future. *ATLA*; 37, suppl2:1-6.
9. Barakat, M, El-Kadi A, du Souich P., 2001. L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sciences* 69: 1559–1571..
10. Batista, DA; Portuondo, DF; Betancourt, J; Urdaneta, L. 2006. Adjuvant effect and toxicity profile of a particulate natural product. *Vaccine*;24S2 (S2/96–52/102)..
11. Batista, D.A; Betancourt, JE; Fong, O, Ramírez, K., Alfonso, A.; Salas, H.; Puente, E; Urdaneta, I; Wawoe, N., Colón M., Pascual JR., Martínez C. 2000. Evaluación de la toxicidad a dosis repetida de la Solución CM-95 tratada magnéticamente en ratas Sprague-Dawley por via intraperitoneal. Informe Técnico. Centro de Toxicología y Biomedicina.
12. Beck, I, Gerlach H., Burkhardt, E., Kaleta, E.F., 2003., Investigation of several selected adjuvants regarding their efficacy and side effects for the production of a vaccine for parakeets to prevent a disease caused by a paramyxovirus type 3. *Vaccine* 21: 1006–1022.
13. 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.
14. Behzad, H., Huckriede, AL., Haynes, L., Gentleman, B., Coyle K, Wilschut JC, Kollmann TR, Reed SG, McElhaney JE. 2012. GLA-SE, a synthetic toll-like receptor 4 agonist, enhances T-cell responses to influenza vaccine in older adults. *J Infect Dis*, 205:466-473.

15. Bleau, A-M ; Maurel, P ; Pichette, V ; Leblond, F; du Souich, P., 2003. Interleukin-1h , interleukin-6, tumour necrosis factor-  $\alpha$  and interferon-  $\gamma$  released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1,1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 473, 197 – 206.
16. Bogdanos, DP; Smith, H; Ma Y, Baum H, Mieli-Vergani G, Vergani D. 2005. A study of molecular mimicry and immunological cross-reactivity between hepatitis B surface antigen and myelin mimics. *Clin Dev Immunol*;12(3), 217–24.
17. Bogdanos, DP; Rigopoulou EI. 2006. Self-mimicking autoimmune domains of hepatitis C virus core antigen. *Vaccine* 24, 6173–6174.
18. Borges, J., Tegtmeier, F., Torio. N., Mueller, M., Lang, E., Bjoern, G. 2003. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Engineering*, 9(3), 441-450.
19. Bourguignon P, Bisteau M, Abarca J, Veenstra S, Hermand P, Henderickx V, et al. 1999. Reactogenicity in the nose and the brain of enterotoxins administered intranasally to mice. In: *Proceedings of the Cold Spring Harbor Conference on Molecular Approaches to Vaccine Design*, December 2–5;23.
20. Bozhedomov, V, Teodorovich, O. Epidemiology and causes of autoimmune male infertility. *Urología*. 2005; (1):35-44.
21. Braun, J., Bollow. M., Remlinger G, 1998. Prevalence of spondyloarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum*; 41: 58–67.
22. Brennan, F., Dougan G. 2005. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine*, 23, 3210–3222.
23. Bynoe, M S., Viret, C. 2008. Foxp3+CD4+ T cell-mediated immunosuppression involves extracellular nucleotide catabolism. *T Immunol*; 29: 99-102.
24. Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B., Pacitto, A., Cortese, M., O’Hagan, D., De Gregório, E., Seubert, A., Wack, A., 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823.
25. Carvalho, L., Ruiz, R., Scaramuzzi, K., Marengo, E., Matos. J., Tambourgi. D., Fantini, M., Sant’Anna, O. 2010., Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine* 28, 7829–7836..
26. Chandra, Sh., Singh, D., Singh, T.; 2009. Prediction and characterization of T-cell epitopes for epitope vaccine design from outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Bioinformation* Volume 5(4): 155-161.
27. Chen RT, Pless R, DeStefano F. . 2001 Epidemiology of autoimmune reactions induced by vaccination. *J Autoimmun* 16(3), 309-18.

28. Chiavolini, D., Weir, S., Murphy, JR., 2008. *Neisseria meningitidis* PorB, a Toll-like receptor 2 ligand, improves the capacity of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to protect mice against experimental tularemia. *Clin Vacc Immunol* ; 15, 1322-1329..
29. Clifford, V., Wadsley, J, Jenner, B, Buttery, J., 2010. Mumps vaccine associated orchitis. Evidence supporting a potential immune-mediated mechanism. *Vaccine* 28: 2671–2673.
30. Cooper, PD., McComb, C., Steele, EJ. 1991, The adjuvanticity of Algamulin, a new vaccine adjuvant. *Vaccine* (1)., 408–415.
31. Corradin, G., Giudice G. 2005. Novel Adjuvants for Vaccines *Curr. Med. Chem.*;4: 1-7.
32. Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.
33. Couch, R., 2004. Nasal Vaccination, *Escherichia coli* Enterotoxin, and Bell's Palsy *N Engl J Med.* 350;9:860-861.
34. Cubillos, C., de la Torre, BG., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J. 2008, Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol*;82(14):7223–30.
35. Damle, NK, Doyle, LV., 1989, IL-2-activated human killer lymphocytes but not their secreted products mediate increase in albumin flux across cultured endothelial monolayers. Implications for vascular leak syndrome. *J. Immunol.* 142(8):2660-2669.
36. Dean, J.H., Descotes, J., Kuper, F. , Luster, M.I., Ross, P.S., Schuurman, H.J., Selgrade, M.J., de Swart, R.L., Van Loveren, H., Vos, J.G., Wester, P.W., Zapata, A.G., 1996., Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. In: *Environmental Health Criteria*, 180. World Health Organization, Geneva.
37. De Gregorio, E., D'Oro, U., Wack, A., 2009. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. *Curr Opin Immunol*, 21, 339-345.
38. De Groot, AS., Bosma, A, Chinai, N., Frost, J., Jesdale, BM., Gonzalez MA., From genome to vaccine: in silico predictions, ex vivo verification. *Vaccine* 2001;19:4385–95.
39. Descotes, J., 1985 Immunomodulating agents and hepatic drugs metabolism. *Drug Metab Rev*; 16: 175-183.
40. Descotes J. 2000. Autoimmunity and toxicity testing. *Toxicol Lett*; 112–113: 461–465.
41. Descotes J., 2004. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective *Toxicol Lett* 149:103–108.
42. Descotes J. 2006. Methods of evaluating immunotoxicity. *Exp Op Drug Metabol Toxicol*, ; 2(2), 249-259.
43. Descotes, J., Vial, T., 2007. Flu-Like Syndrome and Cytokines In: House R.V and Descotes J. Ed *Cytokines in human health. Immunotoxicology, pathology, and therapeutic applications.* Humana Press Inc, USA.

44. Dietert, RR, Dietert, JM, Gavalchin, J., 2010. Risk of autoimmune disease: challenges for immunotoxicity testing. In: Dietert RR, editor. Immunotoxicity testing: method and protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press.
45. Draize, J., Woodard, G., Calvery, HO., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 82, 377–390.
46. D'Souza, RM., Campbell-Lloyd S, Isaacs D, 2000;. Adverse events following immunisation associated with the 1998 Australian Measles Control Campaign *Commun Dis Intell* 24:27–33.
47. Duffus, JH., Templeton, DM., Nordberg M. Concepts in Toxicology. Cambridge CB4 0WF, UK. RSC Publishing, ed. 2009.
48. Dus Santos, MJ., Wigdorovitz, A., Maradei, E., Periolo, O., Smitsart, E., Borca, MV., 2000. A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. *Vet Res Comm*;24(4),261–73.
49. Eble, PL., Bouma, A., Weerdmeester, K., Stegeman, JA., Dekker, A. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine*;25(6),1043–54.
50. Edelman, R., Hardegree, MC., Chedid, L., 1980. Summary of an international symposium on potentiation of the immune response to vaccines. *J Infect Dis.*, 141, 103-5.
51. Emminger W, Emminger-Schmidmeier W, Peters C., 1990. Capillary leak syndrome during low dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh GM-CSF) treatment of a patient in a continuous febrile state. *Blutalkohol*; 61:219–221.
52. 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.
53. Feavers, IM., Pizza, M., 2009. Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine*; 27S, B42–B50.
54. Fijak, M., Bhushan, S. Meinhardt A The Immune Privilege of the Testis. In. W. K. H. Krause and R. K. Naz (eds.), *Immune Infertility*, 69 Springer Verlag Berlin Heidelberg 2009.
55. Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., 2001. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum Reprod Update* 7:444–449.
56. Fujihashi, K., Koga, T., van Ginkel, F.W., Hagiwara, Y., McGhee, J.R., 2002. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine* 20, 2431-2438.
57. 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.

58. Gad, SC., 1988., A scheme for the prediction and ranking of relative potencies of dermal sensitizers based on data from several systems. *J Appl Toxicol* 8(5),361-8.
59. Galli, E., Feijoo, L 2002. Citocromo p-450 y su importancia clínica. *Rev Neuropsiq*; 65: 187-201.
60. 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.
61. 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. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 184–191.
62. Gennari, A., Ban, M., Braun, A., Casati, S., Corsini, E., Dasty J., Descotes J., 2005. The use of in vitro systems for evaluating immunotoxicity: The report and recommendations of an ecvam workshop. *J Immunotoxicol*, 2:61–83.
63. Gherardi, RK., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L, Moretto, P., Dreyfus PA., 2001. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*;124(Pt 9):1821–31.
64. Gherardi, RK, Authier, FJ. 2012. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus* 21, 184–189.
65. Guilherme L, Kalil J-. 2002., Rheumatic fever: the T cell response leading to autoimmune aggression in the heart. *Autoimmun Rev* 1: 261–266.
66. Gil, J., Betancourt, L., Sardiñas, G., Yero, D., Niebla, O., Delgado, M., García, D., Pajón, R., Sánchez, A., González L., Padrón, G., Campa, C, Sotolongo, F., Barberá, R., Guillén, G., Herrera, L., Besada, V. 2009. Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385. *Human Vaccines* 5:5, 347-356
67. Gilboa, E. 2004. The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 4:401–411.
68. Girard, M. 2005. Autoimmune hazards of hepatitis B vaccine. *Autoimm Rev*; 4: 96-100.
69. Gizurarson, S. 1990. Animal models for intranasal drugs delivery studies. *Acta Pharmacol Nod* 2 (2):105-122.
70. Gizurarson, S.; Tamura, S.; Kurata, K.; Hasiguchi, K. and Ogawa, H. 1991. The effect of cholera toxin and cholera toxin B subunit on the nasal mucosal membrane. *Vaccine* 9: 825-832.
71. Gizurarson, S., Georgsso, Vn, G., Aggerbeck, H., Thorarinsdottir, H., Heron, I., 1996. Evaluation of local toxicity after repeated intranasal vaccination of guinea-pigs. *Toxicology* 107, 61-68.
72. Glenny, A.T., Buttle, G.A.H., Stevens, M.F., 1926. Rate of disappearance of diptheria toxoid injected in rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol Bacteriol* 34, 267.
73. Goldenthal, K., Cavagnaro, JA., Alving, C., Vogel, FR., 1993. Safety evaluation of vaccine adjuvants: National Cooperative Vaccine Development Meeting Working Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9 (Supl 1), S47-S51.

74. Goto, N, Kato, H., Maeyama, J., Shibano, M., Saito, T., Yamaguchi, J., Yoshihara, S. 1997. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* 15, 1364–1371.
75. Gout O, Lyon-Caen O. 1998. Sclerotic plaques and vaccination against hepatitis B. *Rev Neurol*; 154: 205-207.
76. Granoff, DM., Moe, GR., 2001. Molecular mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B polysaccharide. *Int Rev Immunol* 20(2):201-20.
77. Gribble, E.J., Sivakumar, P.V., Ponce, R.A., Hughes, S.D., 2007. Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert Op Drug Metabol Toxicol* 3, 209-234.
78. Guazzone, VA., Hollwegs, S., Mardirosian, M., Jacobo, P., Hackstein, H., Wygrecka, M., Schneider, E., Meinhardt, A., Lustig, L., Fijak, M.. 2011 Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. *Int J Androl.* 34(3):276-89.
81. Guis, S., Pellissier, JF., Nicoli, F., Reviron, D., Mattei, JP., Gherardi, RK. HLA-DRB1\*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum* 2002 Sep;46(9):2535-7.
82. 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.
83. Gupta, SK., Simita, S., Sarangi, AS., Srivastava, M., Akhoun, B., Rahman, Q., Gupta SK, 2010. In silico CD4+ T-cell epitope prediction and HLA distribution analysis for the potential proteins of *Neisseria meningitidis* serogroup B—A clue for vaccine development *Vaccine* 28:7092–7097.
84. Guzmán, L., López, R., Llerena, G., Pino, J., Retuerto, F., 2005. Male germinal epithelium recovery in mice treated with only dose of Busulfan. *Rev Per Biol*;12(1): 205-10.
85. Hagman, R., 2011. Serum  $\alpha$ -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1):52-9.
86. Hanly, W. C.; Bennet, T. B. and Artwohl, J. E., 1997. Overview of adjuvants. Information resources for adjuvants and antibody production. Comparison and alternative technologies. *AWIC Res Ser.* 3: 1-8.
87. Harandi, AM; Medaglini, D., Shattock, R. 2010. Vaccine adjuvants: A priority for vaccine research. *Vaccine* 28: 2363–2366.
88. Hardegree, M.C., Pittman, M., 1966. Influence of antigens on release of free fatty acids from Arlcel A (mannide monooleate). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY* 123, 179-184.
89. Harrison, OB., Evans, NJ., Blair, JM., Grimes, HS., Tinsley, CR., Nassif, X., Kriz, P, Ure, R, Gray SJ, Derrick JP, Maiden, MCJ., Feavers, IM. 2009. Epidemiological evidence for the role of the hemoglobin receptor HmbR in meningococcal virulence. *J Inf Dis*;200:94-8.
90. Harkema, J.R.,1990.Comparative pathology of nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ Health Perspective*; 85: 231-238.

91. Hauguel, TM., Hackett ChJ. 2008. Rationally-designed vaccine adjuvants: separating efficacy from toxicity. *Front Bioscience* 13, 2806-2813.
92. Herroelen, L, de Keyser, J, Ebinger G., 1991. Central-nervous-system demyelination after immunisation with recombinant hepatitis B vaccine. *Lancet*; 338: 1174- 1175.
93. Hill, D.J., Griffiths, NJ., Borodina, E, Virji M. 2010. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci*, 118, 547–564.
94. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, EO., Kono, H., Rock. KL, 2008., Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*;9(8):847–56.
95. Ioannou, X., Gomis, S., Karvonen, B, Hecker, R, Babiuk L, van Drunen L., van den Hurk, S., 2002. CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein Vaccine, 21,127–137.
96. Ichihara, I, Pelliniemi, LJ. 2007. Morphometric and ultrastructural analysis of stage-specific effects of Sertoli and spermatogenic cells seen after short-term testosterone treatment in young adult rat testes. *Annals Anatom*;189(5):520-32.
97. Illum, L., 2003. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 87, 187-198.
98. 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 Sprague Dawley. *VacciMonitor*; 18(1):1-7.
99. Itoh M, De-Rooij D, Takeuchi Y 1995. Mode of inflammatory cell infiltration in testes of mice injected with syngeneic testicular germ cells without adjuvant. *J Anatom*, 187:671-9.
100. Jacobo P, Guazzone VA, Theas MS, Lustig L 2010 Testicular autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 20.
101. Jacobsen, SJ.; Sy, LS.; Ackerson, BK.; Chao, Ch.; Slezak, JM.; Cheetham, TC.; Takhar, HS.; Velicer, Ch; Hansen, J.; Klein, N.; 2012. An unmasking phenomenon in an observational post-licensure safety study of adolescent girls and young women. *Vaccine* 30:4585– 4587.
102. Janeway CA, Medzhitov R 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216,
103. Jang, S., Lillehoj, H., Lee, S., Lee, K., Lillehoj, E., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S. 2011. Montanide™ IMS 1313 N VG PR nanoparticle adjuvant enhances antigen-specific immune responses to profilin following mucosal vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vet. Parasitol.* article in press.
104. Jurk, M. et al., 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol*, 3(6):499.

105. Kawai, T., Akira Sh. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373-384.
106. Kensil, C., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D. 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *Int. Immunol.* 146, 431-437.
107. Krause, W.K., Naz RK. (eds.), *Immune Infertility*, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2009.
108. Kuczyk, MA., Denil, J, Thon, WF. 1994. Orchitis following mumps vaccination in an adult. *Urol Int*;53:179–80.
109. Kushima, K., Oda, K., Sakuma, S., Furusawa, S., Fujiwara, M., 2007. Effect of prenatal administration of NSAIDs on the immune response in juvenile and adult rats. *Toxicology* 232, 257-267.
110. Lacour, S., Antonios, D., Gautier, JC., Pallardy., M. 2009., Acetaminophen and lipopolysaccharide act in synergy for the production of pro-inflammatory cytokines in murine RAW264.7 macrophages. *J Immunotoxicol.* 6(2):84-93.
111. Lahiri, A., Das, P., Chakravorty D., 2008. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine* 26:6777–6783
112. Lastre, M., Pérez, O., Labrada, A., Bidot, I., Pérez, J., Bracho G., 2006. Bacterial derived proteoliposome for allergy vaccines. *Vaccine.*,12;24 Suppl 2:S2–34-5.
113. Leenaars, P.P., Hendriksen, C.F., Angulo, A.F., Koedam, M.A., Claassen, E., 1994. Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. *Vet Immunol Immunopathol* 40, 225-241.
114. 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. *Lab Animals* 32, 387-406.
115. Leitner, W.W. 2012. Vaccine adjuvants: is the pipeline clogged? *Immunotherapy* 4 (6), 565–567.
116. Leroux-Roels, G., 2009. Prepandemic H5N1 influenza vaccine adjuvanted with AS03: a review of the pre-clinical and clinical data. *Expert opinion on biological therapy* 9, 1057-1071.
117. Lewis, D.J., Huo, Z., Barnett, S., Kromann, I., Giemza, R., Galiza, E., Woodrow, M., Thierry-Carstensen, B., Andersen, P., Novicki, D., Del Giudice, G., Rappuoli, R., 2009. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. *PloS one* 4, e6999.
118. Lindblad, E.B., 2004. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine* 22: 3658-3668.
119. Liu, T., Huang, JC., Lu, CL., Yang, JL., Hu, ZY., Gao, F., Liu, YX., 2010. Immunization with a DNA vaccine of testis-specific sodium-hydrogen exchanger by oral feeding or nasal instillation reduces fertility in female mice. *Fertility Sterility* 93(5):1556-66.

120. Liu, Y., Zhou, W., You, C., Zheng, H., You, H., Liu, H., 2006. An autoimmune domain-reduced HCV core gene remains effective in stimulating anticore cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine*;24(10):1615–24.
121. Lo, H., Tang, CM., Exley, RM., 2009. Mechanisms of avoidance of host immunity by *Neisseria meningitidis* and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis.* 9(7):418-27.
122. Lopez, OJ., Sadir, AM., Borca, MV, Fernandez, FM., Braun, M, Schudel, AA ,1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet Immunol Immunopathol*;24(4):313–21.
123. Lüepke, N. 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd. Chem. Toxic.*, 23, 287-291.
124. Luster, M., Simeonova, P., Gallucci, R., Bruccoleri, A., Blazka, M., Yucesoy, B., 2001. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 120, 317–32.
125. Magalhaes, E.S., Paiva, C.N., Souza, H.S., Pyrrho, A.S., Mourao-Sa, D., Figueiredo, R.T., Vieira-de-Abreu, A., Dutra, H.S., Silveira, M.S., Gaspar-Elsas, M.I., Xavier-Elsas, P., Bozza, P.T., Bozza, M.T., 2009. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J* 23, 1262-1271.
126. Marichal, T., Ohata, K., Bedoret, D., Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira Sh, Ishii K, Bureau F, Desmet, C., 2011. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine*, 17(8):996-1002.
127. Marrack, P., McKee, A., Munks, M., 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 9(4): 287–293.
128. Martinon F., Mayor A. Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Ann Rev Immunol.* 2009;27, 229–265.
129. Massa, C. Melani C, Colombo M.P.,2005. Chaperon and adjuvant activity of hsp70: different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Res.* 65, 7942–7949.
130. Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annl Rev Immunol* 12, 991-1045.
131. Matzinger, P. 2001. The Danger Model in Its Historical Context. *Scand J Immunol* 54(1-2): 4-9.
132. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
133. Meroni, P. 2011. Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): Old truths and a new syndrome?. *J Autoimmun*;36:1-3.

134. Mesa, C., de León J., Rigley K., Fernández Luis E. 2004. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation *Vaccine* 22: 3045–3052.
135. Mora, D., Domínguez, R., Duque, E., Martínez, L., Escoto, J., Jacobo, O. 2006 Adjuvants: Present regulatory challenges. *Vaccine* 24S2:S2/88–S2/89.
136. 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.
137. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, et al. 2004. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350: 896–903.
138. Mutwiri, G.; Gerdt, 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. Vaccine* 10(1), 95–107.
139. Naim, J, van Oss C, Wu W, Giese R, Nickerson P. 1997. Mechanisms of adjuvancy: I-Metal oxides as adjuvants. *Vaccine*, 15 (11): 1183-1193.
140. 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.
141. Ng, G., Chau, E., Shi, Y., 2010. Recent Developments in Immune Activation by Uric Acid Crystals. *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 58:273–277.
142. Noe, S., Green, M., HogenEsch, H., Hem S. 2010. Mechanism of immunopotentiality by aluminum-containing adjuvants elucidated by the relationship between antigen retention at the inoculation site and the immune response. *Vaccine* 28, 3588–3594.
143. Obidike I, Maduabuchi I, Olumuyiwa S. 2007. Testicular morphology and cauda epididymal sperm reserves of male rats exposed to Nigerian Qua Iboe Brent crude oil. *J Vet Sci*; 8(1):1-5
144. Ochoa R., Sierra G., Martínez I., Cuevas I. 2010. *Prevención de la enfermedad meningocócica*. Ed. Finlay. Ciudad Habana.
145. O'Hagan D.T., Rappuoli R 2004. The safety of vaccines. *Drug Discov. Today*. 9(19): 846-854.
146. O'Hagan, DT, Wack, A., Podda, A., MF59 2007. Is a Safe and Potent Vaccine Adjuvant for Flu Vaccines in Humans: What Did We Learn During Its Development? *Clin Pharmacol Ther* (82)6: 740-744.
147. Olive, C., Toth, I., Jackson, D., 2001. Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies. *Med Chem*, 1, 429-438.
148. Orbach, H., Agmon-Levin, N., Zandman-Goddard, G., 2010. Vaccines and autoimmune diseases of the adult. *Discov Med.*;9(45):90-7.
149. Ossa, H., Manrique, A., Quintanilla, S., Peña, A., 2007. Polimorfismos del sistema HLA (loci A\*, B\* y DRB1\*) en población colombiana. *NOVA* 9: 1-100.

150. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245:194–205.
151. Paiva, C.N., Arras, R.H., Magalhaes, E.S., Alves, L.S., Lessa, L.P., Silva, M.H., Ejzemberg, R., Canetti, C., Bozza, M.T., 2009. Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction. *J Leukoc Biol* 85, 855-861.
152. Paradoa, ML., Middleton, D., Acosta, A., Sarmiento, ME., Leyva, J. 2000. Genes HLA en una muestra de población cubana. *Vaccimonitor* 9(3):1-5
153. Pereira, ME., Macri, NP., Creasy, DM. 2011. Evaluation of the rabbit nasal cavity in inhalation studies and a comparison with other common laboratory species and man. *Toxicol Pathol*, 000: 1-8,
154. Pérez, O., Bracho, G., Lastre, M et al., Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. 2002 Patent application Cu 2002–0292.
155. Pérez, O., González, E., Romeu, B., del Campo, J., Acevedo, R., Lastre, M., et al. Vacunas unitemporales. Patent applied OCPI, CU/P/2008/215. Noviembre 19. 2008.
156. Pérez, O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, González D, Gil D, et al. 2006. Proteoliposome.derived cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine*, 24S2: S2/52-S2/53.
157. Pérez, O., Bracho, GR., Lastre, M., Sierra, VG., Campa, C., Mora, 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](http://www.ocpi.cu/boletines/boletin_244_ago_2008.pdf)].
158. Pérez O., Lastre M., Cabrera O., del Campo J., Bracho G. Cuello M., Balboa J, et al., 2007. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scand J Immunol* 66, 271–277.
159. Pettersson A, Maas A, van Wassenaar D, van der LP, Tommassen J. Molecular characterization of FrpB, the 70-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1995;63(10):4181–4.
160. Persing DH, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Baldrige D. Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants. In. Schijns, V.E. and O'Hagan D.T (eds) *Immunopotentiators in modern vaccines*. 1<sup>st</sup> edn. Elsevier Acad Press. 2006. USA.
161. Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., Tschopp, J., 2007a. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current opinion in immunology* 19, 615-622.
162. Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., Tschopp, J., 2007b. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* 14, 1583-1589.
163. Petrovsky, N. 2008. Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma. *Expert Rev. Vaccines* 7(1), 7–10.

165. Piatti, PG., Berinstein, A., Lopez, OJ., Borca, MV., Fernandez, F., Schudel, AA., 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol* 72 (7):1691–4.
166. Pilla, L., Squarcina, P., Coppa, J., Mazzaferro, V., Huber, V., Pende, D., Maccalli, C., Sovena, G., Mariani, L., Castelli, C., Parmiani, G., Rivoltini, L., 2005. Natural killer and NK-Like T-cell activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor- derived heat shock protein 96. *Cancer Res.* 65, 3942–3949.
167. Pitkanen, J., Peterson P. 2003. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Gen Immun;* 4:12-21.
168. Poland, GA. 2010a Vaccinomics and bioinformatics: Accelerants for the next golden age of vaccinology. *Vaccine* 28: 3509-3510.
169. Poland, GA. 2010b. Vaccidents and adversomics. *Vaccines* 28: 6549-6550.
170. Prater, MR., Johnson, V.J., Germolec, D.R., Luster, M.I., Holladay, S.D., 2006. Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice. *Vaccine* 24, 263-271.
171. 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.
172. 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.
173. Rafi, A.Q., Zeytun, A., Bradley, M.J., Sponenberg, D.P., Grayson, R.L., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., 1998. Evidence for the involvement of Fas ligand and perforin in the induction of vascular leak syndrome. *J. Immunol.* 161(6):3077-3086.
177. Rafi, A.Q, Chen, D, Schmits, R, Mak, T.W, Grayson, R.L, Sponenberg, D.P, Nagarkatti, M, Nagarkatti, P.S., 1999. Evidence for the involvement of CD44 in endothelial cell injury and induction of vascular leak syndrome by IL-2. *J. Immunol.* 163(3):1619-1627.
178. Raghupathy, R., 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18, 478-482.
179. Rammensee, F., Stevanovic, E., Bachmann, C 1997. MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, *Immunogenetics.*; 41:178-228.
180. Rao, VP., Kajon, AE., Spindler, E., Carayanniotis, G. 1999., Involvement of epitope mimicry in potentiation but not initiation of autoimmune disease. *J Immunol* , 162: 5888–5893.
181. Ravel, G., Descotes, J., Animal models of autoimmune diseases and their use in safety evaluation studies. *Persp Exp Clin Immunotoxicol* 2007; 1: 31-40.
182. Rechner. I., Brito-Babapulle, F, Fielden, J. 2003. Systemic capillary leak syndrome after granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Hematol J*;4:54–56.

183. Reed SG, Bertholet S, Coler, RN. Friede, M., 2008. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology* (30)1: 23-32.
184. Rennels. MB., Deloria, MA., Pichichero, ME., Englund, JA., Anderson, EL., Steinhoff, MC., Decker, MD; Edwards, KM, 2002. Lack of consistent relationship between quantity of aluminium in diphtheria–tetanus–acellular pertussis vaccines and rates of extensive swelling reactions. *Vaccine* 20: S44–S47.
185. Renton, KW., Gray, JD., Hall, RI. 1980. Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination. *Can Med Assoc J*, 123: 288-290.
186. Renton, KW. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicology* 2000; 142:229-37.
187. Renton, K.W., 2001. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Therapeutics* 92, 147-163.
188. Rimaniol, A.C., Gras, G., Verdier, F., Capel, F., Grigoriev, V.B, Porcheray, F., Sauzeat, E., Fournier, J.G., Clayette, P., Siegrist, C.A., Dormont, D., 2004. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 22(23-24):3127-35.
189. Rival, C., Lustig, L., Iosub R, Guazzone VA, Schneider E, Meinhardt A, Fijak, M., 2006. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell and Tissue Research* 324(2)::311-8.
190. Rival, C., Theas, MS., Suescun MO, Jacobo, P., Guazzone V, van Rooijen N Lustig L, 2008. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *The Journal of Pathology*, 215(2):108-17.
191. Rodríguez, LM., Giraldo, MC., García, N., Velásquez, L., París, SC., Álvarez, CM., García, LF. 2007. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *Biomédica* 27:537-47
192. Rodríguez, T, Pérez, O, Manager, 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(10):1312–21.
193. Root-Bernstein R 2007 Antigenic complementarity in the induction of autoimmunity: A general theory and review. *Autoimmun Rev* 6:272– 277.
194. Rose, NR. 2010. Autoimmunity, infections and adjuvants. *Lupus*; 19(4): 354-358.
195. Ryan, KR., Patel, SD., Stephens, LA., Anderton, SM. 2007. Death, adaptation and regulation: The three pillars of immune tolerance restrict the risk of autoimmune disease caused by molecular mimicry. *J Autoimmun* (29): 262-271.
196. Ryu, E., Shaey, KC. 1980. Protective effect of zeolite absorbed *Trypanosoma gambiense* inactive vaccines on mice. *Int J Zoonoses*;7(2):101–6.

197. Ryu, E., Shaey, KC. 1981. Immunization of rabbits with zeolite absorbed *Trypanosoma gambiense* inactive vaccine. *Int J Zoonoses*;8(1):91–6.
198. Sai-Kiang Lim. 2003, Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. *Int Immunopharmacol* 3:115–118.
199. Saint-Remy, JM. 1997. Epitope mapping: a new method for biological evaluation and immunotoxicology *Toxicology* 119: 77-81.
200. Santoro, D., Vita, G., Vita, R., Mallamace, A., Savica, V., Bellinghieri, G., Benvenga, S., Gangemi, S., 2010. HLA haplotype in a patient with systemic lupus erythematosus triggered by hepatitis B vaccine. *Clin Nephrol* 74, 150-153.
201. 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.
202. Scheibner, V. 2000. Adverse effects of adjuvants in vaccines. *Nexus* (8)1: 1-14.
203. Schijns, V.E., 2001. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical reviews in immunology* 21, 75-85
204. Schijns, V.E., 2006. Unraveling "the innnnunologists dirty little secret" In: Schijns, V.E. and O'Hagan D.T (eds) *Immunopotentiators in modern vaccines*. 1<sup>st</sup> edn. Elsevier Acad Press. USA, pp 1-16.
205. Schuppe, HC, Meinhardt, A., 2005. Immune privilege and inflammation of the testis *Chem Immunol Allergy*;88:1–14.
206. Segal, BM., Chang, JT., Shevach E.M. 2000. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J. Immunol.* 164: 5683–5688.
207. Segal, B.H., Wang, X.Y., Dennis, C.G., Youn, R., Repasky, E.A., Manjili, M.H., Subject, J.R., 2006. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discovery Today*, 11, (11/12): 534-540.
208. Selmi, C. 2010, Autoimmunity in 2009. *Autoimmun Rev*, 9: 795–800.
209. Seong, SY, Matzinger, P., 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.*;4(6):469-78.
210. Shaw, C.A.; Petrik, M.S. 2009. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem.*, 103(11), 1555-1562.
211. Shoenfeld, Y, Agmon-Levin N., 2011. "ASIA"- Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun*; 36:4-8.

212. Sierra, GV., Campa, HC., Varcacel, NM., Garcia, IL., Izquierdo, PL., Sotolongo, PF., Casanueva, GV., Rico, CO, Rodriguez, CR., Terry, MH. 1991. Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba. NIPH Ann; 14:195–207.
213. Silva, DG., Cooper, PD, Petrovsky, N. 2004. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. Immunology and Cell Biology, 82: 611–616.
214. Simon JK, Edelman E. Clinical evaluation of adjuvants. In. Schijns, V.E. and O'Hagan D.T (eds) Immunopotentiators in modern vaccines. 1<sup>st</sup> edn. Elsevier Acad Press. 2006. USA.
215. Slutter, B., Hageaars, N., Jiskoot, W., 2008. Rational design of nasal vaccines. J Drug Target 16: 1–17.
216. Smith ,G., Stubbins, MJ., Harries. LW., Wolf. CR., 1999. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily.. Xenobiotica 28 (12): pp. 1129-65
217. Spickler, A.R., Roth, J.A., 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. J. Vet Int Med, 17: 273-281.
218. Spielmann, H. 1992. HET-CAM Test. The ERGATT/FRAME. Databank of *in vitro* techniques. INVITTOX; IP-47, 1-9.
219. Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., de Silva, O., 1999. The HET-CAM, A Useful *in vitro* Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. Toxicol. In Vitro 13, 375–384.
220. Srivastava, P.K., Amato, R.J., 2001. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. Vaccine 19, 2590-2597.
221. Stewart-Tull DES. Freund-type mineral oil adjuvant emulsion. In. Stewart-Tull DES The theory and practical application of adjuvants. John Wiley & Sons Ltd 1995: 1-19.
222. Stewart-Tul, DES. Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). In. Immunological adjuvants and vaccines. Gregoriadis A. Ed. Plenum Publishing Corporation, New York 1989.
223. 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. 1<sup>st</sup> edn. Elsevier Acad Press. USA, pp 343-359
224. Sweetman, SC. Martindale: The Complete Drug Reference. Thirty-sixth edition. USA: Pharmaceutical Press, 2009
225. Szekeres-Bartho, J., 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. Int Rev Immunol 21, 471-495.
226. Szelenyi, J. 2001. Cytokines and the central nervous system. Brain Res. Bull.: 54 (4): 329-338.
227. Takahashi, I., Nochi, T., Yuki, Y., Kiyono. 2009. New horizon of mucosal immunity and vaccines. Curr. Opin. Immunol., 21, 352–358.

228. Tanabe, M., Nimigean, CM., Iverson, TM., 2010. Structural basis for solute transport, nucleotide regulation, and immunological recognition of *Neisseria meningitidis* PorB. Proc. National Acad. Sci. USA; 107:6811-6816.
229. Tengamnuay, P., Sahamethapat, A., Sailasuta, A., Mitra, A. 2000. Chitosans as nasal absorption enhancers of peptides: comparison between free amine chitosans and soluble salts. Int. J. Pharmaceutics, 197, 53-67.
230. Teuscher, C., Meeker, ND., Livingstone, KD, Sudweeks, JD., Griffith, JS., Wardell, BB., Hickey, WF. 1994. Experimental allergic orchitis in mice. VII. Preliminary characterization of the spermatogenic autoantigens responsible for eliciting actively and passively induced disease. J. Repr Immunol , 26(3):233-49.
231. Tinsley, C, Nassif, X., 2001. Meningococcal pathogenesis: at the boundary between the pre- and post-genomic eras. Curr Opin Microbiol 4:47–52.
232. Tirado, O., Martinez, E., Rodríguez ,O., Danielsen ,M., Selva, D., Reventós, J, 2003. Methoxyacetic acid dysregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. Biol Rep; 68:1437-46.
233. Tomljenovic, L., Shaw C., 2012. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. Lupus 21, 223–230.
234. Tritto, E., Mosca, F., De Gregorio, E., 2009., Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. Vaccine 27, 3331-3334.
235. Ueda, H., Howson, JM., Espósito, L., Heward, J., Snook, H., 2003. Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G et al.. Association of the T-cell regulatory gene CTLA 4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature, 423:506-511.
236. Ueki, A., Yamaguchi, M., Ueki, H., Watanabe, Y., Ohsawa, G., Kinugawa K. Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. Immunology 1994; 82(2):332–5.
237. van Duin, D., Medzhitov, R., Shaw, A.C., 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. Trends Immunol 27, 49-55.
238. 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.
239. Verdier F. 2002. Non-clinical vaccine safety assessment. Toxicology 74:37-43.
240. Verdier, F., Barrow, P., Burge, J., 2003. Reproductive toxicity testing of vaccines. Toxicology 185: 213-219.
241. Verdier, F., Burnett R., Michelet-Habchi, C., Moretto, P., Fievet-Groyne, F., Sauzeat, E., 2005. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular

- administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine* 23, 11, 1359-1367.
242. Vesikari, T, Knuf, M., Wutzler, P., Karvonen, A., Kieninger-Baum, D., Schmitt, HJ., Baehner, F., Borkowski, A., Tsai, TF., 2011. Oil-in-water emulsion adjuvant with influenza vaccine in young children. *N Engl J Med*, 365:1406-1416.
  243. Vial, T., Descotes, J., 1995. Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors. *Drug Saf* 13, 371-406.
  244. Vial, T., Descotes, J., 2004. Autoimmune diseases and vaccinations. *Eur J Dermatol* 14, 86-90.
  245. Vial, T. Descotes, J. 2007. Clinical adverse effects of cytokines on the immune system. In: House RV & Descotes J ed *Cytokines in Human Health: Immunotoxicology, Pathology and Therapeutic Applications*. Humana Press.
  246. Waghmare, A., Deopurkar, RL., Salvi, N., Khadilkar, M., Kalolikar, M., Gade SK. 2009. Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA35 (Emulsion based) along with incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenom. *Vaccine* 27, 1067–1072.
  247. Waisbren, BA., 2008., Acquired autoimmunity after viral vaccination is caused by molecular mimicry and antigen complementarity in the presence of an immunologic adjuvant and specific HLA patterns. *Med Hypotheses* 70, 346–348.
  248. Weller, R.O., 1998. Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 885-894.
  249. Wetzler, LM., 2010. Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity. *Fut Microbiol*, 5(5):749-58.
  250. Wilson-Welder, J., Torres, M., Kipper, M., Mallapragada, S., Wannemuehler, M., Narasimhan, B. *Vaccine Adjuvants: Current Challenges and Future Approaches*. *Journal of pharmaceutical Sciences* 2009 (98)4: 1278-1316.
  251. Wilson, HL; Kovacs-Nolan, J., Latimer, L., Buchanan, R., Gomis, S., Babiuk, L., van Drunen, S. 2010. A novel triple adjuvant formulation promotes strong, Th1-biased immune responses and significant antigen retention at the site of injection. *Vaccine* 28: 8288–8299.
  252. Wise, LD., Pauley, CJ., Michael, B., Wolf, JJ. 2010. Lack of effects on male fertility from a quadrivalent HPV vaccine in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Research. Part B, Develop Reprod Toxicol* 89(5):376-81.
  253. Wolf, J., Kaplanski, C, Lebron, J. 2010. Nonclinical safety assessment of vaccines and Adjuvants. In. G. Davies (ed.), *Vaccine Adjuvants, Methods in Molecular Biology* 626, Springer Science+Business Media, LLC: 29-40.
  254. Wucherpfennig, KW. 2001. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest*; 108: 1097–1104.

255. Wyrobeck A, Bruce W. 1975. Induction of sperm abnormalities in mice. National Academy of Sciences; 72:4425
256. Xu, W., Zhang, X., Chen, W., Fok, KL, Rowlands DK, Chui YL, Chan HC. 2010. Immunization with Bin1b decreases sperm motility with compromised fertility in rats. *Fertility Sterility* , 93(3):952-958.
257. Yang, Y, Wu, Ch., Morrow, W. 2004. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine* 22,1524–1536.
258. Yang, Y, Shen S. 2007. Enhanced antigen delivery via cell death induced by the vaccine adjuvants. *Vaccine* 25: 7763–7772.
259. Yang, KH., Lee, JH., Lee, MG., 2008a. 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.
260. Yang, K.H., Jung, Y.S., Lee, D.Y., Lee, J.H., Kim, Y.C., Lee, M.G., 2008b. Time-dependent effects of *Klebsiella pneumoniae* Endotoxin (KPLPS) on the pharmacokinetics of theophylline in rats: return of the parameters in 96-hour KPLPS rats to the control levels. *Drug Metabol Disp* 36(5):811-815.
261. 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*. Aug;38(4):303-14.
262. Zabielska, K., Lechowski, R., Król M., Pawłowski, KM., . Motyl, T., Dolía, I., Żbikowski., 2012 Derivation of feline vaccine-associated fibrosarcoma cell line and its growth on chick embryo chorioallantoic membrane – a new in vivo model for veterinary oncological studies. *Vet Res Commun* (en prensa) DOI 10.1007/s11259-012-9 535-9
263. Zhou, ZZ., Zheng, Y., Steenstra, R., Hickey, WF, Teuscher, C., 1989. Actively-induced experimental allergic orchitis (EAO) in Lewis/NCR rats: sequential histo- and immunopathologic analysis. *Autoimmunity* 3(2):125-34.

## AUTOBIBLIOGRAFIA Y PRODUCCION CIENTIFICA VINCULADA A LA TESIS

**Publicaciones que forman parte de la tesis (publicadas, aceptadas o enviadas a publicación hasta octubre 2012):**

1. Aníbal Domínguez, Maibia Tamayo, Irela Y. Pérez, Hilario Salas, Oliver Pérez, Alexander Batista. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. **VacciMonitor 2009; Vol. 18 No. 3: 13-17**
2. Alexander Batista Duharte, Gisela Murillo Jorge, Ulpiano Pérez Marqués, Enieyis Tur Naranjo, Deivys Portuondo Fuentes, Oliver Pérez Martín. Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCO1 por el método de HET-CAM. **VacciMonitor 2011; 20(1):22-27.**
3. Batista, D.A., Quattrocchi, V., Olivera, C., Langellotti, C, Pappalardo, S, Di Giacomo, S. et al.. Adjuvant effect of Cliptox<sup>TM</sup> on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. **Vaccine 2010; 28, 361–66. (Premio Anual de la Salud 2011 en artículo científico)**
4. Batista-Duharte, A., Lindblad, E., Oviedo, E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. **Toxicology. Letter. 2011; 203: 97–105.**
5. Pérez, O; Batista-Duharte A., González, E.; Zayas C, Balboa J., Cuello M., Cabrera, O. M. Lastre and V.E.J.C. Schijns. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2012) 45: in press.**
6. Batista-Duharte A. Vaccine and autoimmunity. A strange association under intense debate. **Rev. Per. Med Exp SP 2012; 29(2): 265-71.**
7. Alexander Batista Duharte, Onel Fong Lores, José Carlos Rodríguez Tito, Edgar Puente Zapata, Oliver Pérez Martín. Efecto del adyuvante vacunal AFCo1 intranasal sobre la concentración plasmática de teofilina en ratas. **MEDISAN 2012;16( 8): 1284-1294.**
8. Alexander Batista-Duharte, Oliver Pérez. Immunological adjuvants. Determinants in the balance efficacy-toxicity of the contemporary vaccines. **Enf Infecc Microbiol Clin (Enviada).**

### **Premios relacionados con la tesis:**

- **Premio de la Academia de Ciencias 2009**, en colaboración con el Instituto Finlay por los trabajos relacionados con la evaluación de irritabilidad nasal del AFCo1 por HET-CAM..
- **Premio de la Sociedad Latinoamericana de Inmunología (ALAI)**, para participación en Congreso Latinoamericano de Inmunología **InmunoChile 2009**. Trabajo presentado: Non biological consequences of mimicry between proteins of *Neisseria meningitidis* B contained in AFCo1 and testis proteins (Póster).
- **Premio relevante de Fórum de Ciencia y Técnica de Base, Ramal y Provincial 2010**. Esta en estos momentos a nivel de **gran jurado nacional**. Validación del HET-CAM para estudios de irritación de vacunas y adyuvantes (No se ha realizado Evento de Fórum Nacional hasta la fecha (julio 2012)
- **Premio Anual de la Salud** en categoría **Artículo Científico** a nivel provincial y nacional 2011. Adjuvant effect of Cliptox<sup>TM</sup> on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice.
- **Premio de la Sociedad Latinoamericana de Inmunología (ALAI)** para participación en X Congreso Latinoamericano de Inmunología **InmunoPerú 2012**. Trabajo presentado: Molecular mimicry between *Neisseria meningitidis* B antigens and self-proteins is insufficient condition for triggering post-vaccination autoimmunity with OVM-derived adjuvants (presentación oral).
- **Premio Anual de la Salud 2012. Nivel Provincial. Categoría: Tema de actualización**. Avances en la comprensión de los mecanismos de acción/toxicidad de adyuvantes vacunales y estrategias de evaluación para vacunas más seguras en Cuba

### **Eventos científicos más importantes donde se han presentado resultados de la tesis:**

1. IV Congreso Internacional de Toxicología TOXICOLOGIA 2007.
2. I Simposio Territorial de Farmacología y Toxicología Preclínica. TOXIMED febrero 2008.
3. Internacional Workshop of Immunopharmacology. Varadero abril 2008.
4. Congreso Nacional de Inmunología. Camaguey 2008.
5. IX Congreso Latinoamericano de Inmunología. Viña del Mar. Chile noviembre 2009.

6. II Conferencia Internacional TOXICUBA 2009. Santiago de Cuba. Noviembre 2009
7. Jornada provincial de Agentes Biológicos. Santiago de Cuba. Diciembre 2009
8. Fórum de Ciencia y Técnica de base junio 2010 Ponencia Relevante.
9. Fórum de Ciencia y Técnica de la Univ. de Ciencias Médicas agosto 2010 Ponencia Relevante
10. Fórum de Ciencia y Técnica de Ramal provincia Ponencia Relevante
11. Internacional Workshop Neisseria Vaccines 2011. Mayo 2011 Varadero Cuba
12. Internacional Congreso Immunopharmacology 2011 Mayo 2011 Varadero Cuba
13. Concurso Premio Anual de la Salud Evento Nacional Noviembre 2011 La Habana Cuba.
14. VI International Congress on Vaccine Adjuvants and II International Congress on Allergen Vaccines. Varadero, junio 2012).
15. X Congreso Latinoamericano de Inmunología InmunoPerú 2012 (Lima junio 2012).

### **Tesis tuteladas vinculadas a la tesis**

#### Trabajos de Diploma

1. Evaluación del efecto adyuvante y perfil de seguridad de un producto natural. Deivys Portuondo Fuentes. (Licenciatura en Biología). Univ. de Oriente
2. Determinación *in silico* de mimetismo molecular entre PorB y proteoma humano y de ratón Bruno Téllez Martínez, Liziet Galano (Licenciatura en Biología). Univ. de Oriente
3. Efecto del Adyuvante Completo de Freund sobre la hepatotoxicidad de paracetamol de Noel Pérez García (Licenciatura en Bioquímica. Universidad de La Habana)

#### Maestrías

1. Evaluación del efecto adyuvante y toxicidad del adyuvante inmunológico Cliptox. Deivys Portuondo Fuentes. Maestría de Biotecnología. Universidad de Oriente
2. Relevancia biológica del mimetismo molecular entre proteínas de *Neisseria meningitidis B* y proteínas propias. Maybia Tamayo Irsula. Maestría de Biotecnología. Universidad de Oriente

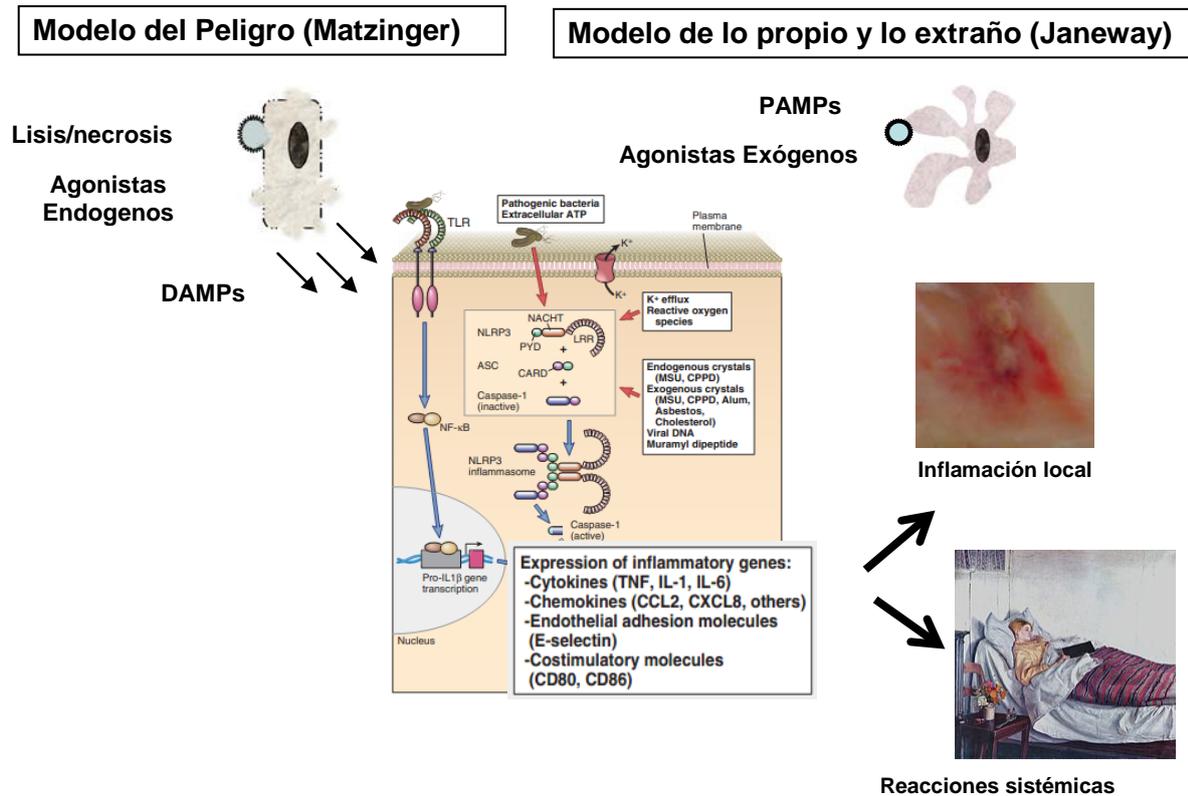
## ANEXOS

### 1 Adyuvantes en vacunas actualmente licenciadas para uso en humanos

	Adyuvante	IE	SL	IP	Vacuna	Productor
1	Al(OH) <sub>3</sub>	If I	X	Th2	Varias	Brentag Biosector
2	Al <sub>4</sub> (OHPO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	If I	X	Th2	Varias	Brentag Biosector
3	AlOHPO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	IPV	X	?	Gardasil™	Merck
4	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	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 VLP	Th1	Cervarix™	GSK
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. \*Las sales de aluminio incluyen al menos tres estructuras que se utilizan en dependencia de las características químico-físicas del antígeno y su adsorción al gel que se forma al hidratar la sal: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio.

## 2. Mecanismos Generales de la toxicidad de los adyuvantes

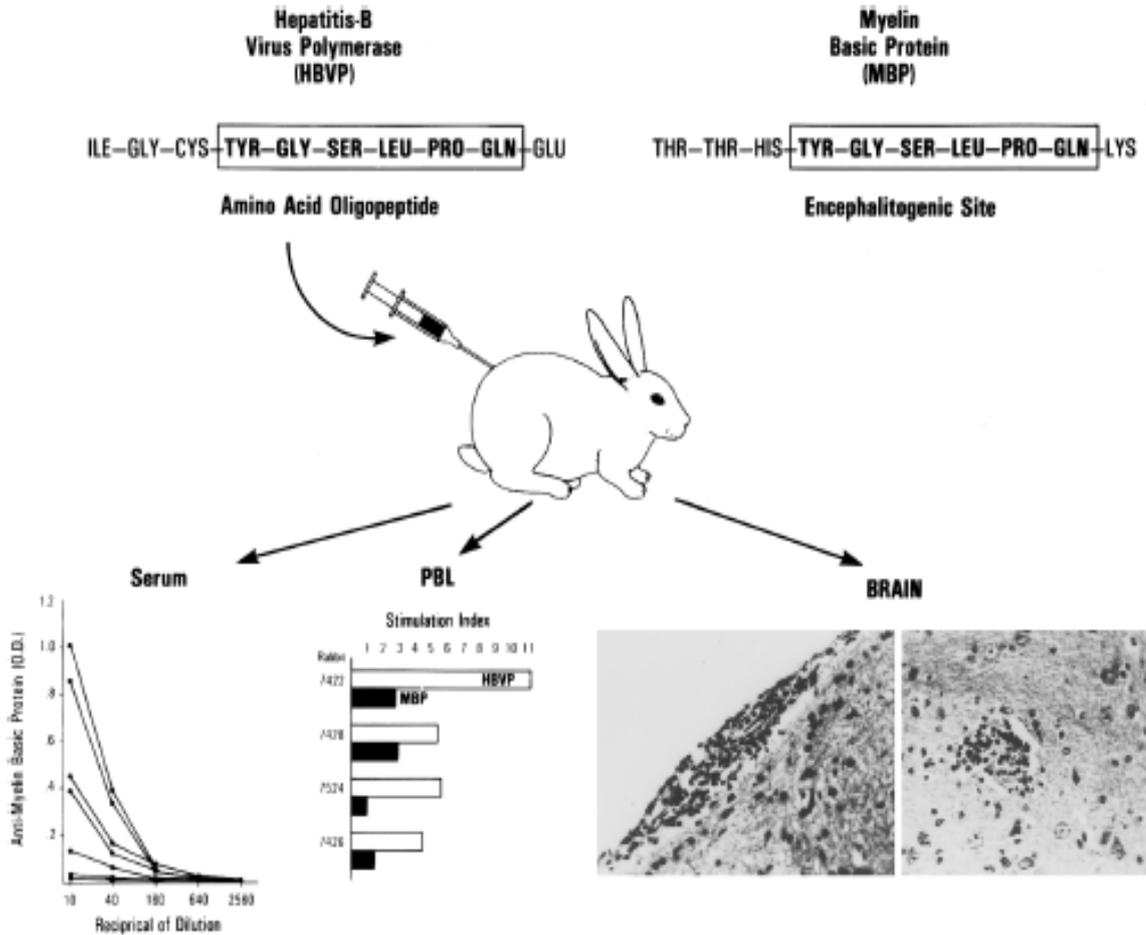


### Representación esquemática de los eventos de inmunotoxicidad que pueden ocurrir después del uso de adyuvantes vacunales

Después de la inoculación, los adyuvantes pueden producir lesiones tisulares directas tales como irritación, lisis o necrosis sin la intervención del sistema inmune (toxicidad directa no inmune) que inducen la liberación de moléculas intracelulares que sirven de señales de daño celular. Los mecanismos inmunológicos pueden ser activados a través de dos vías (no excluyentes): las señales de daño liberadas luego de la necrosis celular DAMPs (Modelo del Daño) o por patrones moleculares extraños al organismo presentes en agentes patógenos conferidos por el propio adyuvante (PAMPs). Tanto los DAMPs como los PAMPs se acoplan a los receptores de reconocimiento de patrones TLRs y NLR, presentes en células dendríticas y otras células del sistema inmune innato. Estos eventos tempranos promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias que consolidan la reacción local y cuando son liberadas al sistema circulatorio produce manifestaciones sistémicas de inmunotoxicidad. *PAMPs: pathogen-associated microbial patterns, TLR: toll-like receptors, DAMPs: danger-associated molecular patterns, NLR: NOD-like receptors.*

Nota: Esta figura representa una situación teórica extrema y no representa ningún adyuvante en particular.

**3. Primera demostración experimental de que el mimetismo molecular en vacunas puede inducir trastornos autoinmunes de importancia clínica**



En este estudio 7 de 11 conejos inmunizados con una vacuna anti-hepatitis conteniendo una secuencia mimética con Proteína Básica de Mielina, desarrollaron cuadros de parálisis y lesiones en el sistema nervioso central semejantes a la esclerosis múltiple (Fujinami y Oldstone., 1985)

#### 4. Reportes de sospechas de asociaciones entre vacunas y manifestaciones autoinmunes

<b>Vacuna</b>	<b>Manifestaciones autoinmunes asociadas</b>
Hepatitis B	<p><u>Trastornos reumáticos:</u> Artritis reumatoidea, artritis reactiva, exacerbación de LES, síndrome de Sjögren, vasculitis, crioglobulinemia, poliartralgia, poliarteritis nudosa, mialgia, fatiga.</p> <p><u>Reacciones cutáneas:</u> Eritema nudoso, eritema multiforme, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia localizado, liquen plano.</p> <p><u>Trastornos neurológicos:</u> Encefalitis, meningitis aséptica aguda, mielitis transversa, neuritis óptica, neuropatía de los plexos lumbar y braquial, síndrome de Guillain–Barre, parálisis de Bell, ataxia cerebelar aguda, miastenia grave, esclerosis múltiple</p> <p><u>Trastornos hematológicos:</u> Trombocitopenia, anemia hemolítica immune, anemia aplástica</p> <p><u>Otras manifestaciones:</u> Síndrome nefrótico, uveítis, alopecia, pericarditis aguda, enfermedad de Graves.</p>
Hepatitis A	Hepatitis autoinmune
Influenza	<p><u>Trastornos reumáticos:</u> Purpura de Henoch-Schoenlein, poliangeitis microscópica, artritis reactiva, vasculitis de células gigantes, polimialgia reumática, crioglobulinemia, poliartralgia, fatiga.</p> <p><u>Trastornos neurológicos:</u> Meningoencefalitis/encefalitis, neuritis óptica, mielitis transversa, neuritis braquial, síndrome de Guillain–Barre, parálisis de Bell,</p> <p><u>Trastornos hematológicos:</u> Linfocitopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune,</p> <p><u>Trastornos cardíacos:</u> Miocarditis aguda, pericarditis aguda</p> <p><u>Otras manifestaciones:</u> Diabetes mellitus tipo I, síndrome nefrótico, uveítis, miositis, eritema multiforme</p>
Parotiditis/ Rubeola/ Sarampión	<p><u>Trastornos reumáticos:</u> Artritis y artralgia aguda, artritis crónica, miositis</p> <p><u>Trastornos neurológicos:</u> Encefalitis, meningitis aséptica, mielitis, neuritis óptica, síndrome de Guillain–Barre.</p> <p><u>Trastornos hematológicos:</u> Trombocitopenia/purpura trombocitopénica aguda, síndrome hemolítico urémico, anemia hemolítica</p>
Varicela	<p><u>Trastornos reumáticos:</u> Artritis o artralgia, vasculitis (usualmente Henoch-Schoenlein)</p> <p><u>Trastornos neurológicos:</u> Encefalitis, meningitis aseptica, mielitis, neuritis óptica, síndrome de Guillain–Barre., ataxia cerebelar transitoria, neuritis óptica, mielitis transversa, síndrome de Guillain–Barre, parálisis de Bell,</p> <p><u>Trastornos hematológicos:</u> Trombocitopenia, anemia aplástica</p> <p><u>Cutánea:</u> Eritema multiforme</p>
Vacuna antipoliomilítica	<p><u>Trastornos reumáticos:</u> Artritis aguda</p> <p><u>Trastornos neurológicos:</u> Encefalitis, síndrome de Guillain–Barre</p> <p><u>Trastornos hematológicos:</u> Anemia hemolítica autoinmune</p>
Rabia	<p><u>Trastornos neurológicos:</u> Síndrome de Guillain–Barre, mielitis, meningitis, autoanticuerpos contra sustancia blanca, proteína básica de mielina y cardiolipina en relación directa con las complicaciones neurológicas.</p> <p><u>Otras:</u> Cuadro similar a enfermedad del suero</p>
Viruela	<p><u>Trastornos neurológicos:</u> Encefalopatía postvacunal, encefalomielitis</p> <p><u>Otras:</u> Eritema multiforme, miopericarditis, cardiomiopatía dilatada.</p>
Difteria/ toxoides tetánico	<u>Trastornos neurológicos:</u> Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central, síndrome de Guillain–Barre
Enfermedad de Lyme	Artritis crónica
BCG	Artritis, enfermedad de Reiter

## 5. Criterios sugeridos para el diagnóstico de 'ASIA' \* (Shoenfeld y Agmon-Levin 2011), traducido y reproducido con autorización de sus autores)

### *Criterios Mayores*

- **Exposición a un estímulo externo (infección, vacuna, silicona, adyuvantes), previo a las manifestaciones clínicas.**
- **Manifestaciones clínicas típicas**
  - **Mialgia, miositis o debilidad muscular**
  - **Artralgia y/o artritis**
  - **Fatiga crónica con trastornos del sueño**
  - **Manifestaciones neurológicas (especialmente asociadas a desmielinización)**
  - **Trastornos cognitivos, pérdida de la memoria**
  - **Pirexia, sequedad de los labios**

### *Criterios Menores*

- **Presencia de autoanticuerpos o anticuerpos contra el adyuvante sospechoso**
- **Otras manifestaciones clínicas como el síndrome del colon irritable**
- **HLA específicos en el paciente (Ej: HLA DRB1, HLA DQB1)**
- **Desarrollo de una enfermedad autoinmune (Ej: Esclerosis múltiple)**

## 6 Guías de evaluación de seguridad de vacunas y adyuvantes

<b>Guías Regulatorias</b>	<b>Vacunas</b>
Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology (CBER, FDA, 1985).	Vacunas recombinantes
Notes for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines (CPMP/SWP/465/95).	Todas
ICH Document S6: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (CPMP/ICH/302/95).	Todas las vacunas y biológicos
Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventative Infectious Disease Indications (CBER, FDA, 1996).	Vacunas de ADN
Notes for Guidance on Pharmaceutical and Biological Aspects of Combined Vaccines (CPMP/BWP/477/98).	Vacunas combinadas
Guidance for Industry. Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy (CBER, FDA, 1998).	Vectores virales y vacunas basadas en células
Points to Consider on Human Somatic Cell Therapy (CPMP/BWP/41450/98).	Vacunas basadas en células
Note for Guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (CPMP/BWP/3088/99).	Vectores virales y Vacunas de ADN
Guidance for Industry. Considerations for Reproductive Toxicity Studies for Preventative Vaccines for Infectious Disease Indications (CBER, FDA, 2000 (draft)).	Vacunas para mujeres en edad fértil
Points to Consider on the Development of Live Attenuated Influenza Vaccines (CPMP/BWP/2289/01)	Vacunas contra influenza
Note for Guidance on the Development of Vaccinia Virus Based Vaccines Against Smallpox (CPMP/1100/02)	Vacunas contra Smallpox
WHO guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines (WHO/BS/03)	Todas las vacunas
Guideline on the scientific data requirements for a Vaccine Antigen Master File (VAMF) (EMA/CPMP/BWP/3734/03)	VAMF
Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use. (2005) EMA EMA/CHMP/VEG/134716/2004	Adyuvantes vacunales
Developmental Toxicity Studies for Preventative and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications. (2006) CBER,	Vacunas para mujeres en edad fértil
FDA. Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. (2007) CBER, FDA.	Vacunas de ADN

## 7. Secuencias de aminoácidos de las 5 proteínas mayores de *N.meningitidis B* evaluadas

### Proteína PorB (331 a.a)

```

10      20      30      40      50      60
MKKSLIALTL AALPVAAMAD VTLYGTIKAG VETSRSEVHN GGQVSVETG TGIVDLGSKI
      70      80      90      100     110     120
GFKGQEDLGN GLKAIWQVEQ KASIAGTDSG WGNRQSFIGL KGGFGKLRVG RLNSVLKDTG
      130     140     150     160     170     180
DINPWDSKSD YLGVNKAIEP EARLISVRYD SPEFAGLSGS VQYALNDNAG KYNSESYHAG
      190     200     210     220     230     240
FNYKNGGFFV QYGGAYKRHV RVDENVNIEK YQIHRLVSGY DNDALHASVA VQQQDAKLVE
      250     260     270     280     290     300
DNYSHNSQTE VAATLAYRFG NVTPRVSYAH GFKGLFDDAD LSNDDYDQVVV GAEYDFSKRT
      310     320     330

```

SALVSAGWLQ EGKGENKFVS TAGGVGLRHK F

### Proteína HmbR (786 a.a)

```

10      20      30      40      50      60
MLPIAALVGS IFGNPVLAAE EAATETTPVK AEIKAVRVKG QRNAPAAVER VNLNRIKQEM
      70      80      90      100     110     120
IRDNKDLVRY STDVGLSDSG RHQKGFVAVRG VEGNRVGVSI DGVNLPDSEE NSLYARYGNF
      130     140     150     160     170     180
NSSRLSIDPE LVRNIEIVKG ADSFNTGSGA LGGGVNYQTL QGRDLLLDDR QFGVMMKNGY
      190     200     210     220     230     240
STRNREWTNT LGFGVSNDRV DAALLYSQRR GHETESAGNR GYAVEGEGSG ANIRGSARGI
      250     260     270     280     290     300
PDSSKHKYHS FLGKIAYQIN DNHRIGASLN GQQGHNYTVE ESYNLTASSW READDVNRRR
      310     320     330     340     350     360
NANLFYEWMP DSNWLSSLKA DFDYQKTKVA AVNKNKGFPM DYSTWTRNYN QKDLDEIYNR
      370     380     390     400     410     420
SMDTRFKRFT LRLDSHPLQL GGRHRHLSFK TFSRRDFEN LNRDDYFSG RVVRTTSSIQ
      430     440     450     460     470     480
HPVKTTNYGF SLSDQIQWND VFSSRAGIRY DHTKMPQEL NAECHADCKT PPAANTYKGW
      490     500     510     520     530     540
SGFVGLAAQL NQAWRVGYDI TSGYRVPNAS EVYFTYNHGS GNWLPNPNLK AERSTHTTLS
      550     560     570     580     590     600
LQGRSEKGM L DANLYQSNYR NFLSEEQKLT TSGTPGCTEE NAYYGICSDP YKEKLDWQMK
      610     620     630     640     650     660
NIDKARIRGI ELTGRLNVDK VASFVPEGWK LFGSLGYAKS KLSGDNSLLS TQPLKVIAGI
      670     680     690     700     710     720
DYESPSEKWG VFSRLTYLGA KVKDAQYTV YENKGGWGPL QKKVKDYPWL NKSAYVFDY
      730     740     750     760     770     780
GFYKPAKNLT LRAGVYNLFN RKYTTWDSL R GLYSYSTTNA VDRDGKGLDR YRAPGRNYAV SLEWKF

```

## Proteína FrpB (714 a.a)

```
10      20      30      40      50      60
MNTPLFRLSL LSLTLAAGFA HAAENNAKVV LDTVTVKGDR QGSKIRTNIV TLQQKDESTA
      70      80      90      100     110     120
TDMRELLKEE PSIDFGGGNG TSQFLTLRGM GQNSVDIKVD NAYSDSQILY HQGRFIVDPA
      130     140     150     160     170     180
LVKVVSVQKG AGSASAGIGA TNGAIITKTV DAQDLLKGLD KNWGVRLNSG FASNEGVSYG
      190     200     210     220     230     240
ASVFGKEGNF DGLFSYNRNN EKDYEAGKGF RNNFNGGKTV PYSALDKRSY LAKIGTSFGD
      250     260     270     280     290     300
GDHRIVLSHM KDQHRGIRTV REEFTVGGDK ERISMERQAP AYRETTQSNT NLAYTGKNLG
      310     320     330     340     350     360
FVEKLDANAY VLEKERYSD DSGTGYAGNV KGNHTQITT RGMNFNFSR LAEQTLKYG
      370     380     390     400     410     420
INRHRQEIKP QAFINSQFKI EDKEKATDEE KNKNRENEKI AKAYRLTNPT KTDTGAYIEA
      430     440     450     460     470     480
IHEIDGFTLT GGLRYDRFKV KTHDGKTVSS NNLNPSFGVI WQPHEHWSFS ASHNYASRSP
      490     500     510     520     530     540
RLYDALQTHG KRGIISIADG TKAERARNTE IGFNYNDGTF AANGSYFWQT IKDALANPQN
      550     560     570     580     590     600
RHDSVAVREA VNAGYIKNHG YELGASYRTG GLTAKVGVSH SKPRFYDTHK DKLLSANPEF
      610     620     630     640     650     660
GAQVGRWTWA SLAYRFQNPN LEIGWRGRYV QKAVGSILVA GQKDRNGKLE NVVRKGFQVN
      670     680     690     700     710
DVFANWKPLG KDTLNVNLSV NNVFNTFYYP HSQRWNTLP  GVG RDVRLGV NYKF
```

## Proteína OpC (272 a.a)

```
10      20      30      40      50      60
MKKTVFTCAM IALTGTAAAA QELQTANEFT VHTDLSSISS TRAFLEKHKH AAKHISVRAD
      70      80      90      100     110     120
IPFDANQGIR LEAGFGRSKK NIINLETDEN KLGKTKNVKL PTGVPENRID LYTGYTYTQT
      130     140     150     160     170     180
LSDSLNFRVG AGLGFESSKD SIKTTKHTLH SSRQSWLAKV HADLLSQLGN GWYINPWSEV
      190     200     210     220     230     240
KFDLNSRYKL NTGVTNLKGD INQKTNGWGF GLGANIGKKL GESASIEAGP FYKQRTYKES
      250     260     270
```

GEFSVTTKSG DVSLTIPKTS IREYGLRVGI KF

## Proteína OpA (270 a.a)

MNPAPKKPSLLFSSLLFSSLLFSSAAQAASEDGRSPYYVQADLAYAERITHDYPQATGANNTSTVSDYFRNIR  
THSIHPRVSVGYDFGDWRIAADYASYRKWVNDNKYSVNTKNVQVKNKSNRQDLKTENQENGTFHAVSSLGLSAVYD  
FNTGSRFKPYAGVRVAYGHVRHSIDSTKKTNNVLTVPNTNIPGGTPTIYNQGSTQDAYHESHRSIRRLGLGVVAGVGFDT  
PKLTLDTGYRYHNWGRLENTFRFKTHEVSLGVRYRF.

## 8. Epítopes T CD4 y CD8 de *N. meningitidis* B seleccionados

### Péptidos de Por B que se acoplan a MHC - I (Epítape T CD8<sup>+</sup>)

HLA-A*0201											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	5	L	I	A	L	T	L	A	A	L	29
2	99	G	L	K	G	G	F	G	K	L	26
3	136	K	I	A	E	P	E	A	R	L	26
4	48	E	T	G	T	G	I	V	D	L	24
5	4	S	L	I	A	L	T	L	A	A	23
6	67	D	L	G	N	G	L	K	A	I	23
7	7	A	L	T	L	A	A	L	P	V	22
8	15	V	A	A	M	A	D	V	T	L	21
9	52	G	I	V	D	L	G	S	K	I	21
10	107	L	R	V	G	R	L	N	S	V	21

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en: <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de Por B que se acoplan a MHC - II (Epítape T CD4<sup>+</sup>)

HLA-DRB1*0101																	
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
1	256	A	Y	R	F	G	N	V	T	P	R	V	S	Y	A	H	31
2	101	K	G	G	F	G	K	L	R	V	G	R	L	N	S	V	28
3	178	H	A	G	F	N	Y	K	N	G	G	F	F	V	Q	Y	27
4	18	M	A	D	V	T	L	Y	G	T	I	K	A	G	V	E	26
5	94	R	Q	S	F	I	G	L	K	G	G	F	G	K	L	R	26
6	134	V	N	K	I	A	E	P	E	A	R	L	I	S	V	R	26
7	151	S	P	E	F	A	G	L	S	G	S	V	Q	Y	A	L	26
8	293	E	Y	D	F	S	K	R	T	S	A	L	V	S	A	G	26
9	3	K	S	L	I	A	L	T	L	A	A	L	P	V	A	A	25
10	50	G	T	G	I	V	D	L	G	S	K	I	G	F	K	G	25

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en: <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de HmbR que se acoplan a MHC - I (Epítape T CD8<sup>+</sup>)

HLA-A*0201											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	735	T	L	R	A	G	V	Y	N	L	27
2	384	Q	L	G	G	G	R	H	R	L	25
3	653	L	L	S	T	Q	P	L	K	V	25
4	5	Q	M	L	P	I	A	A	L	V	24
5	171	L	L	D	D	R	Q	F	G	V	24
6	164	T	L	Q	G	R	D	L	L	L	23

7	639	S	L	G	Y	A	K	S	K	L	23
8	646	K	L	S	G	D	N	S	L	L	23
9	8	P	I	A	A	L	V	G	S	I	22
10	490	G	L	A	A	Q	L	N	Q	A	22
11	635	K	L	F	G	S	L	G	Y	A	22
12	4	L	Q	M	L	P	I	A	A	L	21
13	135	E	L	V	R	N	I	E	I	V	21
14	155	A	L	G	G	G	V	N	Y	Q	21
15	375	T	L	R	L	D	S	H	P	L	21
16	377	R	L	D	S	H	P	L	Q	L	21
17	749	T	T	W	D	S	L	R	G	L	21
18	21	V	L	A	A	D	E	A	A	T	20
19	71	D	L	V	R	Y	S	T	D	V	20
20	129	R	L	S	I	D	P	E	L	V	20

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en: <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de HmbR que se acoplan a MHC - II (Epítotope T CD4<sup>+</sup>)

HLA-DRB1*0101																	
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
1	677	F	S	R	L	T	Y	L	G	A	K	K	V	K	D	A	36
2	159	G	V	N	Y	Q	T	L	Q	G	R	D	L	L	L	D	35
3	748	Y	T	T	W	D	S	L	R	G	L	Y	S	Y	S	T	34
4	90	G	F	A	V	R	G	V	E	G	N	R	V	G	V	S	33
5	137	V	R	N	I	E	I	V	K	G	A	D	S	F	N	T	33
6	6	M	L	P	I	A	A	L	V	G	S	I	F	G	N	P	32
7	324	K	A	D	F	D	Y	Q	K	T	K	V	A	A	V	N	31
8	440	Q	I	Q	W	N	D	V	F	S	S	R	A	G	I	R	31
9	10	A	A	L	V	G	S	I	F	G	N	P	V	L	A	A	30
10	620	R	L	N	V	D	K	V	A	S	F	V	P	E	G	W	30
11	189	N	R	E	W	T	N	T	L	G	F	G	V	S	N	D	29
12	500	R	V	G	Y	D	I	T	S	G	Y	R	V	P	N	A	29
13	506	T	S	G	Y	R	V	P	N	A	S	E	V	Y	F	T	28
14	634	W	K	L	F	G	S	L	G	Y	A	K	S	K	L	S	28
15	674	W	G	V	F	S	R	L	T	Y	L	G	A	K	K	V	28
16	250	K	H	K	Y	H	S	F	L	G	K	I	A	Y	Q	I	27
17	485	W	S	G	F	V	G	L	A	A	Q	L	N	Q	A	W	27
18	518	Y	F	T	Y	N	H	G	S	G	N	W	L	P	N	P	27
19	253	Y	H	S	F	L	G	K	I	A	Y	Q	I	N	D	N	26
20	279	G	H	N	Y	T	V	E	E	S	Y	N	L	T	A	S	26

### Péptidos de FrpB que se acoplan a MHC - I (Epítoto T CD8<sup>+</sup>)

HLA-A*0201											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Score
1	44	K	I	R	T	N	I	V	T	L	27
2	116	I	V	D	P	A	L	V	K	V	26
3	7	R	L	S	L	L	S	L	T	L	24
4	9	S	L	L	S	L	T	L	A	A	23
5	568	R	T	G	G	L	T	A	K	V	23
6	21	H	A	A	E	N	N	A	K	V	22
7	119	P	A	L	V	K	V	V	S	V	22
8	297	K	N	L	G	F	V	E	K	L	22
9	304	K	L	D	A	N	A	Y	V	L	22
10	432	G	L	R	Y	D	R	F	K	V	22
11	555	Y	I	K	N	H	G	Y	E	L	22
12	698	T	L	P	G	V	G	R	D	V	22
13	28	K	V	V	L	D	T	V	T	V	21
14	108	I	L	Y	H	Q	G	R	F	I	21
15	144	A	I	I	T	K	T	V	D	A	21
16	416	A	Y	I	E	A	I	H	E	I	21
17	452	N	L	N	P	S	F	G	V	I	21
18	14	T	L	A	A	G	F	A	H	A	20
19	58	S	T	A	T	D	M	R	E	L	20
20	65	E	L	L	K	E	E	P	S	I	20

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en: <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de FrpB que se acoplan a MHC - II (Epítoto T CD4<sup>+</sup>)

HLA-DRB1*0101																	
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
1	122	V	K	V	V	S	V	Q	K	G	A	G	S	A	S	A	32
2	418	I	E	A	I	H	E	I	D	G	F	T	L	T	G	G	30
3	492	R	G	I	I	S	I	A	D	G	T	K	A	E	R	A	29
4	81	T	S	Q	F	L	T	L	R	G	M	G	Q	N	S	V	28
5	510	E	I	G	F	N	Y	N	D	G	T	F	A	A	N	G	28
6	552	N	A	G	Y	I	K	N	H	G	Y	E	L	G	A	S	28
7	663	F	A	N	W	K	P	L	G	K	D	T	L	N	V	N	28
8	8	L	S	L	L	S	L	T	L	A	A	G	F	A	H	A	27
9	162	N	W	G	V	R	L	N	S	G	F	A	S	N	E	G	27
10	227	K	R	S	Y	L	A	K	I	G	T	S	F	G	D	G	27
11	605	G	R	T	W	T	A	S	L	A	Y	R	F	Q	N	P	27
12	5	L	F	R	L	S	L	L	S	L	T	L	A	A	G	F	26
13	60	A	T	D	M	R	E	L	L	K	E	E	P	S	I	D	26
14	124	V	V	S	V	Q	K	G	A	G	S	A	S	A	G	I	26

15	156	L	K	G	L	D	K	N	W	G	V	R	L	N	S	G	26
16	299	L	G	F	V	E	K	L	D	A	N	A	Y	V	L	E	26
17	437	R	F	K	V	K	T	H	D	G	K	T	V	S	S	N	26
18	480	P	R	L	Y	D	A	L	Q	T	H	G	K	R	G	I	26
19	627	G	R	Y	V	Q	K	A	V	G	S	I	L	V	A	G	26
20	84	F	L	T	L	R	G	M	G	Q	N	S	V	D	I	K	25

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de OpC que se acoplan a MHC - I (Epítoto T CD8<sup>+</sup>)

HLA-A*0201											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	189	K	L	N	T	G	V	T	N	L	28
2	156	W	L	A	K	V	H	A	D	L	24
3	260	S	I	R	E	Y	G	L	R	V	24
4	37	S	I	S	S	T	R	A	F	L	22
5	84	N	L	E	T	D	E	N	K	L	22
6	141	S	I	K	T	T	K	H	T	L	22
7	253	S	L	T	I	P	K	T	S	I	22
8	9	A	M	I	A	L	T	G	T	A	21
9	12	A	L	T	G	T	A	A	A	A	20
10	99	K	L	P	T	G	V	P	E	N	20

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de OpC que se acoplan a MHC - II (Epítoto T CD4<sup>+</sup>)

HLA-DRB1*0101																	
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
1	7	T	C	A	M	I	A	L	T	G	T	A	A	A	A	Q	33
2	154	Q	S	W	L	A	K	V	H	A	D	L	L	S	Q	L	32
3	124	S	L	N	F	R	V	G	A	G	L	G	F	E	S	S	30
4	32	H	T	D	L	S	S	I	S	S	T	R	A	F	L	K	29
5	122	S	D	S	L	N	F	R	V	G	A	G	L	G	F	E	28
6	205	T	N	G	W	G	F	G	L	G	A	N	I	G	K	K	27
7	60	G	F	G	L	G	A	N	I	G	K	K	L	G	E	S	26
8	209	G	A	N	I	G	K	K	L	G	E	S	A	S	I	E	26
9	213	G	A	N	I	G	K	K	L	G	E	S	A	S	I	E	26
10	94	K	T	K	N	V	K	L	P	T	G	V	P	E	N	R	25

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de OpA que se acoplan a MHC - I (Epítoto T CD8<sup>+</sup>)

HLA-A*0201											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	195	N	I	P	G	G	T	P	T	I	25
2	218	S	I	R	R	L	G	L	G	V	23
3	222	L	G	L	G	V	V	A	G	V	23
4	141	G	T	F	H	A	V	S	S	L	22
5	115	S	V	N	T	K	N	V	Q	V	20
6	117	V	L	A	F	V	V	A	E	K	20
7	1	M	I	Y	G	I	G	T	D	I	19
8	93	A	L	S	K	W	L	E	E	Q	18
9	10	V	S	L	K	R	I	I	R	L	17
10	48	Y	L	A	K	R	F	A	A	K	17

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de OpA que se acoplan a MHC - II (Epítoto T CD4<sup>+</sup>)

HLA-DRB1*0101																	
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
1	73	S	D	Y	F	R	N	I	R	T	H	S	I	H	P	R	32
2	140	N	G	T	F	H	A	V	S	S	L	G	L	S	A	V	32
3	221	R	L	G	L	G	V	V	A	G	V	G	F	D	I	T	32
4	186	T	T	N	V	L	T	V	P	T	N	I	P	G	G	T	28
5	246	Y	H	N	W	G	R	L	E	N	T	R	F	K	T	H	28
6	152	S	A	V	Y	D	F	N	T	G	S	R	F	K	P	Y	27
7	160	G	S	R	F	K	P	Y	A	G	V	R	V	A	Y	G	27
8	216	S	H	S	I	R	R	L	G	L	G	V	V	A	G	V	27
9	9	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S	26
1	73	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S	26

### Péptidos de Por B que se acoplan a H2-Kd de ratón

H2-Kd											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	267	S	Y	A	H	G	F	K	G	L	26
2	130	D	Y	L	G	V	N	K	I	A	25
3	45	T	E	V	T	T	A	T	G	I	23
4	317	K	F	V	A	T	A	A	S	V	23
5	23	L	Y	G	T	I	K	A	G	V	22
6	182	N	Y	K	N	G	G	F	F	V	21
7	301	S	A	L	V	S	A	G	W	L	21
8	153	E	F	A	G	L	S	G	S	V	19
9	219	G	Y	D	N	D	A	L	Y	A	19
10	284	E	Y	D	Q	V	V	V	G	A	19

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

## Péptidos de HmbR que se acoplan a H2-Kd de ratón

H2-Kd											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	628	S	<b>F</b>	V	P	E	G	W	K	<b>L</b>	26
2	252	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	23
3	487	G	<b>F</b>	V	G	L	A	A	Q	<b>L</b>	23
4	124	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	22
5	481	T	<b>Y</b>	K	G	W	S	G	F	<b>V</b>	22
6	566	N	<b>F</b>	L	S	E	E	Q	K	<b>L</b>	22
7	681	T	<b>Y</b>	L	G	A	K	K	V	<b>K</b>	22
8	757	T	<b>Y</b>	L	G	A	K	K	V	<b>K</b>	22
9	328	D	<b>Y</b>	Q	K	T	K	V	A	<b>A</b>	21
10	410	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	21
11	711	D	<b>Y</b>	P	W	L	N	K	S	<b>A</b>	21
12	148	S	<b>F</b>	N	T	G	S	G	A	<b>L</b>	20
13	326	D	<b>F</b>	D	Y	Q	K	T	K	<b>V</b>	20
14	645	S	<b>K</b>	L	S	G	D	N	S	<b>L</b>	20
15	726	G	<b>F</b>	Y	K	P	A	K	N	<b>L</b>	20
16	128	S	<b>R</b>	L	S	I	D	P	E	<b>L</b>	19
17	697	E	<b>N</b>	K	G	W	G	T	P	<b>L</b>	19
18	30	E	<b>T</b>	T	P	V	K	A	E	<b>I</b>	18
19	287	S	<b>Y</b>	N	L	T	A	S	S	<b>W</b>	18
20	390	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	18

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

## Péptidos de FrpB que se acoplan a H2-Kd de ratón

H2-Kd											
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	416	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	24
2	585	F	<b>Y</b>	D	T	H	K	D	K	<b>L</b>	24
3	566	S	<b>Y</b>	R	T	G	G	L	T	<b>A</b>	23
4	474	N	<b>Y</b>	A	S	R	S	P	R	<b>L</b>	22
5	349	S	<b>R</b>	L	A	E	Q	T	L	<b>L</b>	21
6	372	A	<b>F</b>	L	N	S	Q	F	K	<b>I</b>	21
7	237	S	<b>F</b>	G	D	G	D	H	R	<b>I</b>	20
8	615	R	<b>F</b>	Q	N	P	N	L	E	<b>I</b>	20
9	5	L	<b>F</b>	R	L	S	L	L	S	<b>L</b>	19
10	223	S	<b>A</b>	L	D	K	R	S	Y	<b>L</b>	19
11	613	A	<b>Y</b>	R	F	Q	N	P	N	<b>L</b>	19
12	109	L	<b>Y</b>	H	Q	G	R	F	I	<b>V</b>	18
13	114	R	<b>F</b>	I	V	D	P	A	L	<b>V</b>	18
14	297	K	<b>N</b>	L	G	F	V	E	K	<b>L</b>	18

15	468	S	<b>F</b>	S	A	S	H	N	Y	<b>A</b>	18
16	58	S	<b>T</b>	A	T	D	M	R	E	<b>L</b>	17
17	148	K	<b>T</b>	V	D	A	Q	D	L	<b>L</b>	17
18	229	S	<b>Y</b>	L	A	K	I	G	T	<b>S</b>	17
19	265	T	<b>V</b>	G	G	D	K	E	R	<b>I</b>	17
20	330	V	<b>K</b>	G	P	N	H	T	Q	<b>I</b>	17

Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de OpC que se acoplan a H2-Kd de ratón

H2-Kd		<a href="#">go to top</a>									
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	134	G	<b>F</b>	E	S	S	K	D	S	<b>I</b>	24
2	187	R	<b>Y</b>	0	K	L	N	T	G	<b>V</b>	24
3	74	G	<b>F</b>	G	R	S	K	K	N	<b>I</b>	22
4	166	S	<b>Q</b>	L	G	N	G	W	Y	<b>I</b>	21
5	172	W	<b>Y</b>	I	N	P	W	S	E	<b>V</b>	21
6	254	S	<b>L</b>	T	I	P	K	T	S	<b>I</b>	20
7	141	S	<b>I</b>	K	T	T	K	H	T	<b>L</b>	19
8	190	K	<b>L</b>	N	T	G	V	T	N	<b>L</b>	19
9	27	N	<b>E</b>	F	T	V	H	T	D	<b>L</b>	18
10	219	K	<b>K</b>	L	G	E	S	A	S	<b>I</b>	18

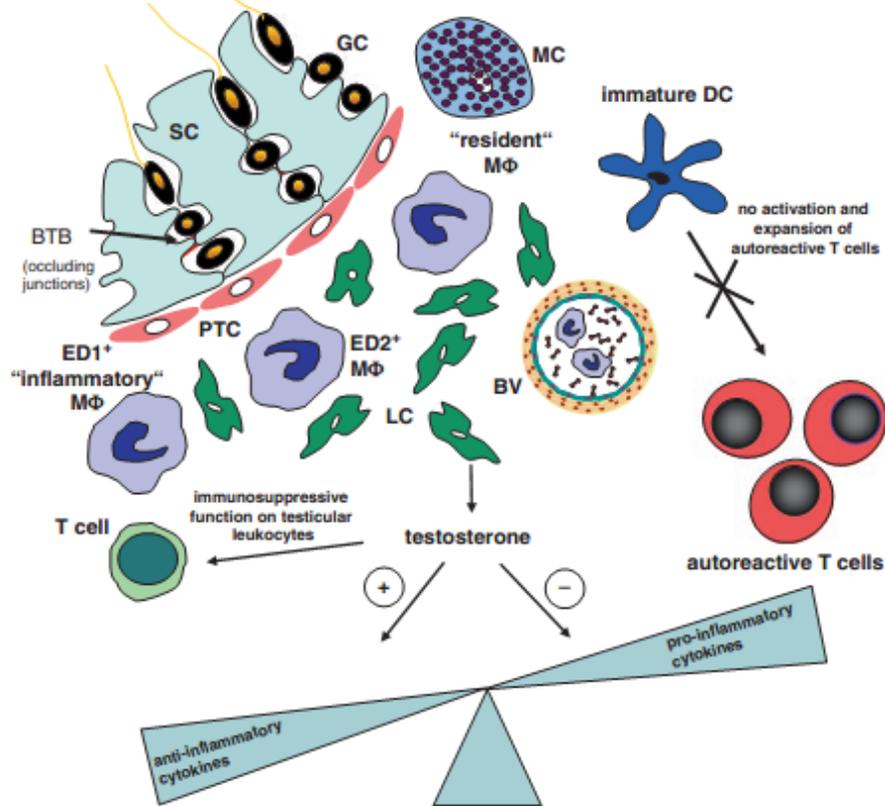
Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

### Péptidos de Opa que se acoplan a H2-Kd de ratón

H2-Kd		<a href="#">go to top</a>									
No	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
1	172	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	24
2	113	K	<b>Y</b>	S	V	N	T	K	N	<b>V</b>	23
3	256	R	<b>F</b>	K	T	H	E	V	S	<b>L</b>	22
4	188	N	<b>V</b>	L	T	V	P	T	N	<b>I</b>	21
5	42	P	<b>Y</b>	Y	V	Q	A	D	L	<b>A</b>	20
6	91	G	<b>Y</b>	D	F	G	D	W	R	<b>I</b>	19
7	2	N	<b>P</b>	A	P	K	K	P	S	<b>L</b>	18
8	26	L	<b>F</b>	S	S	A	A	Q	A	<b>A</b>	18
9	226	V	<b>V</b>	A	G	V	G	F	D	<b>I</b>	17
10	222	L	<b>G</b>	L	G	V	V	A	G	<b>V</b>	16

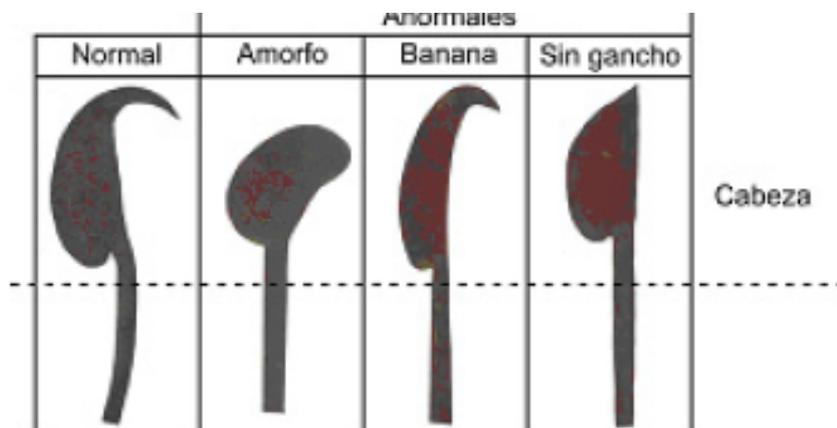
Fuente: Base de datos SYFPEITHI. Disponible en <http://www.syfpeithi.de/>

## 9. Modelo hipotético de factores que regulan el inmunoprivilegio testicular



La barrera hemato-testicular (BTB) conecta las células de Sertoli (SC) y evita el contacto del sistema inmune con los neoantígenos que se expresan durante la meiosis y en las células germinales postmeióticas (GC). En el espacio intersticial los macrófagos (Mφ) ED2+ con función inmunoregulatoria son predominantes, mientras que los macrófagos ED1+ que favorecen la inflamación son minoritarios. El fenotipo de las células dendríticas (Dc) en el testículo normal inhibe la activación y expansión de los clones de linfocitos T autoreactivos. La concentración de testosterona en el líquido intersticial testicular sintetizado por las células de Leydig (LC) están en una concentración de 8-10 veces más alta que en el suero. Los andrógenos tienen función inmunosupresora inhibiendo la función leucocítica y reduciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias. BV: vasos sanguíneos; PTC células peritubulares; MC mastocitos. *Reproducido de: Fijak M, Bhushan S and Meinhardt A The Immune Privilege of the Testis. In. W. K. H. Krause and R. K. Naz (eds.), Immune Infertility, 69 Springer Verlag Berlin Heidelberg 2009.*

## 10. Figuras representativas de cabezas de espermatozoides: normal y con anomalías en su morfología



Wyrobeck A, Bruce W. 1975