



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

## Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas

Alexander Batista-Duharte<sup>a,\*</sup>, Miriam Lastre<sup>b</sup> y Oliver Pérez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro de Toxicología y Biomedicina, Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, Cuba

<sup>b</sup> Departamento de Inmunología, Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay, La Habana, Cuba

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 18 de julio de 2012

Aceptado el 23 de noviembre de 2012

On-line el 17 de enero de 2013

#### Palabras clave:

Adyuvantes  
Vacunas  
Eficacia  
Toxicidad

### R E S U M E N

Para lograr vacunas eficaces y seguras para la prevención de enfermedades infecciosas aún no controladas o re-emergentes, uno de los aspectos de mayor importancia es contar con adyuvantes que permitan inducir una respuesta protectora efectiva con un adecuado perfil de seguridad. El hidróxido de aluminio se ha utilizado como adyuvante en vacunas humanas desde 1926, y solo en los últimos 10 años se han registrado algunos nuevos productos, a pesar de la enorme cantidad de candidatos propuestos, siendo la toxicidad el principal factor que ha limitado su introducción en la clínica. En este trabajo se actualizan los últimos avances en cuanto a mecanismos de acción y toxicidad de los adyuvantes vacunales y se revisan los adyuvantes que han obtenido licencias sanitarias y otros que están próximos a lograrlo.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines

#### A B S T R A C T

To achieve effective and safe vaccines for the prevention of not yet controlled or re-emergent infectious diseases, one of the more importance aspects is to have immunological adjuvants that allow inducing a protective immune response with an appropriate safety profile. Since 1926 the aluminium compounds have been used as adjuvants for human vaccines, and only in the last 10 years some new products have been registered. Although there an enormous quantity of proposed candidates, the toxicity is the main factor that has limited their introduction into the clinic. In this work the mechanism of action are updated, and the toxicity of the immunological adjuvants are revised, especially those that have obtained clinical approval or are close to getting it.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Introducción

Las vacunas constituyen uno de los logros más importantes en la historia de la medicina, pues gracias a su empleo se han controlado varias enfermedades infectocontagiosas. El principal objetivo de la vacunación preventiva es la inducción de una respuesta inmune específica contra un microorganismo patógeno que conduzca a la protección contra la infección o la enfermedad causada por este y que pueda lograrse su total erradicación<sup>1</sup>. Al principio las vacunas estaban formadas por microorganismos vivos atenuados o muertos, y esto traía como consecuencia que con cierta frecuencia se desarrollara la enfermedad en vez de la protección, debido a una

reversión de la virulencia, fundamentalmente en personas inmunodeprimidas. Esto propició que surgiera una nueva generación de vacunas basadas en antígenos purificados, sintéticos o recombinantes, los cuales son más específicos pero menos inmunogénicos, por lo que necesitan de componentes, denominados «adyuvantes», que incrementan la potencia, la calidad y la duración (memoria) de la respuesta inmune<sup>2</sup>. Los adyuvantes también contribuyen a lograr una respuesta inmune efectiva en edades muy tempranas, cuando el sistema inmune aún no está suficientemente maduro y es necesario vacunar contra enfermedades que afectan a niños en esas edades<sup>3</sup>, así como también pueden mejorar el efecto protector de las vacunas en personas inmunodeprimidas y en edades avanzadas<sup>2-4</sup>.

En este artículo se hace una revisión de los avances más importantes sobre los mecanismos de acción y de toxicidad de los adyuvantes como componentes esenciales en las vacunas, y se

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alexander.batista@medired.scu.sld.cu (A. Batista-Duharte).

analizan las tendencias actuales en la investigación, el desarrollo y el uso clínico de estos productos.

### Adyuvantes vacunales. Concepto y breve reseña histórica

Los adyuvantes (del latín *adjuvare*, «ayudar») son sustancias de estructura química muy variada que se utilizan para reforzar la respuesta inmune contra un antígeno administrado simultáneamente<sup>5</sup>. Estos compuestos normalmente se utilizan con varios propósitos: a) como componente esencial de vacunas humanas o veterinarias profilácticas o terapéuticas<sup>6-8</sup>; b) para la producción de anticuerpos poli y monoclonales<sup>9</sup>; c) como herramientas para estudiar la respuesta inflamatoria en biomodelos experimentales<sup>10</sup>, o d) en ensayos toxicológicos para evaluar respuestas de hipersensibilidad<sup>11</sup>.

Los adyuvantes vacunales se introdujeron en la segunda década del siglo xx, cuando Ramon observó que los caballos que desarrollaban abscesos en el sitio de inyección con toxoide diftérico generaban mayores títulos de anticuerpos específicos que aquellos que no los tenían<sup>12</sup>. En 1926, Glenny et al. demostraron la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio mediante el uso de una vacuna de toxoide diftérico precipitado en alúmina<sup>13</sup>. En 1936, Freund et al. desarrollaron una emulsión de agua en aceite mineral que contenía micobacterias muertas, conocida hoy como «adyuvante completo de Freund» (ACF), considerado el adyuvante más poderoso, pero demasiado reactogénico para ser usado en vacunas humanas, y tampoco en veterinarias<sup>14</sup>. En 1956, Johnson et al. demostraron la actividad adyuvante de la endotoxina lipopolisacárida (LPS) proveniente de *Salmonella typhosa*<sup>15</sup>, mientras que, en 1974, Lederer et al. identificaron el muramidipéptido (MDP) como un componente con actividad adyuvante de la micobacteria presente en el ACF<sup>16</sup>.

A partir de estos trabajos pioneros comenzaron a proponerse nuevos candidatos a adyuvantes, intentando reducir la toxicidad y manteniendo la capacidad inmunoestimulante, para dar respuesta a las vacunas de nueva generación que comenzaban a surgir, basadas en antígenos purificados, sintéticos o recombinantes, que son más específicos pero menos inmunogénicos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta hoy, muy pocos adyuvantes han obtenido una licencia sanitaria para el uso en vacunas humanas profilácticas<sup>6</sup>.

### Clasificación

Ha sido muy difícil lograr una óptima clasificación de los adyuvantes, debido a la gran diversidad de estos productos y a que en muchos casos aún no se conocen los mecanismos de acción. Una de las primeras clasificaciones de los adyuvantes, hoy en desuso, la propuso Edelman<sup>17</sup>, según la cual los adyuvantes pueden ser de 3 tipos: inmunoestimulantes activos, proteínas portadoras y adyuvantes tipo vehículo. Otra clasificación basada en la naturaleza de los adyuvantes los divide en adyuvantes de tipo gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados, proteínas de fusión y lipopéptidos, a los que se añaden los inmunomoduladores e inmunoestimulantes como las citocinas y otros compuestos naturales que activan el sistema inmune innato y que no están incluidos en ninguno de los grupos anteriores<sup>18</sup>.

Una clasificación basada en el mecanismo de acción es la propuesta por Schijns, quien los categoriza en: a) facilitadores de la señal 1 (presentación de antígenos); 2) facilitadores de la señal 2 (coestimulación), y 3) facilitadores de la señal 3 (polarización a Th1/Th2)<sup>19</sup>. Más recientemente, O'Hagan y Valiante clasificaron los adyuvantes en: a) inmunopotenciadores (IP) y b) sistemas de liberación (SL)<sup>20</sup>. A esta última clasificación Pérez et al. incorporan

los inmunopolarizantes (IPz), para referirse a los adyuvantes que polarizan la respuesta inmune en una dirección requerida para la protección<sup>21</sup>, la cual se corresponde con la señal 3 en la clasificación de Schijns.

### Mecanismos generales de acción de los adyuvantes

Según la clasificación funcional de Schijns, los adyuvantes actúan de diferentes maneras<sup>22</sup> (fig. 1):

#### Estimulación de la señal 1

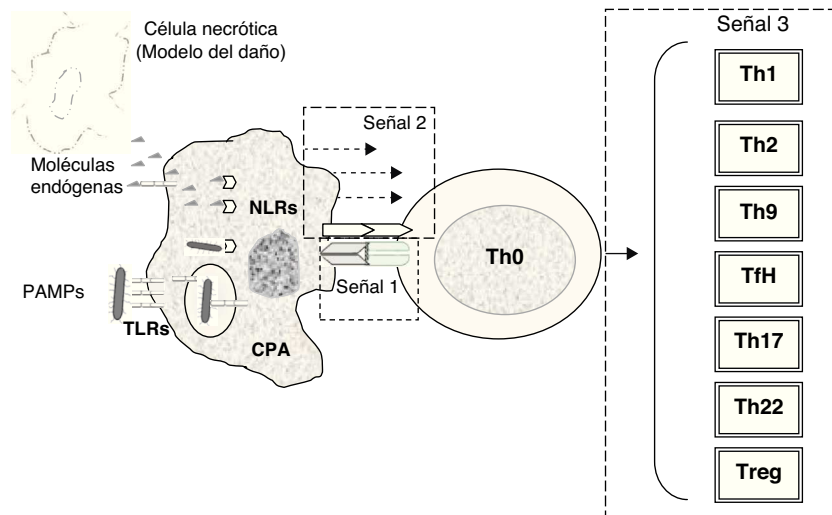
Se basa en el concepto de que la estimulación linfocítica depende de la presentación antigénica en los ganglios linfáticos regionales, por medio de las células presentadoras de antígenos (CPA), fundamentalmente las células dendríticas. Los adyuvantes que tienen un efecto de depósito y que garantizan una lenta y prolongada liberación de antígenos y que además reclutan CPA en el sitio de inoculación, como por ejemplo los geles de aluminio y las emulsiones oleosas, se incluyen dentro de este grupo.

#### Estimulación de la señal 2

La señal 2 de activación requiere la liberación de citocinas en forma soluble o de moléculas coestimuladoras de membrana en las CPA para potenciar la estimulación de la respuesta inmune específica<sup>23,24</sup>. Para esto se requiere una activación previa de las CPA, la cual puede efectuarse por 2 vías no excluyentes: a) Señal 0, que consiste en el reconocimiento de estructuras moleculares específicas presentes en los agentes patógenos, denominados PAMP (del inglés *pathogen-associated molecular pattern*), los cuales se unen a receptores de reconocimiento de patrones moleculares denominados PRR (del inglés *pathogen-recognition receptor*), especialmente los TLR (del inglés *Toll like-receptors*), ubicados en la membrana celular o en los endosomas<sup>25</sup>, o los NLR (del inglés *Nod-like receptors*), ubicados en el citosol<sup>26</sup>. Este modelo de reconocimiento fue descrito por Janeway y se conoce como «modelo de lo propio y lo extraño»<sup>27</sup>, por medio del cual varios adyuvantes, como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas y su derivado monofosforil lípido A (MLPA), oligodeonucleótidos que contienen secuencias no metiladas de ADN bacteriano (CpG ODN), entre otros, estimulan las células de la inmunidad innata. b) A través de moléculas endógenas denominadas señales de peligro, que se liberan cuando hay necrosis celular. Es el conocido «modelo del peligro o del daño» descrito por Matzinger<sup>28</sup>, el cual plantea que para que haya estimulación inmune debe existir un daño celular. Estas moléculas endógenas, que pueden ser proteínas de choque térmico, ácido úrico y ácidos nucleicos, entre otros, también interactúan con los TLR o con los NLR, promoviendo, al igual que los PAMP, la maduración de células dendríticas e induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias y otros mediadores que favorecen la respuesta inmune<sup>19</sup>. Varios adyuvantes actúan por este mecanismo, como las saponinas, algunas emulsiones y el hidróxido de aluminio, los cuales producen citólisis<sup>29-32</sup>. Existen otros PRR que pueden reconocer algunos adyuvantes y participar en su función inmunopotenciadora, como las lectinas tipo C<sup>33,34</sup> y los receptores tipo RIG<sup>35,36</sup>. La tabla 1 muestra varios ejemplos de adyuvantes y otros componentes microbianos que estimulan el sistema inmune innato por medio de su unión a PRR<sup>36</sup>.

#### Estimulación de la señal 3

Las células de la inmunidad innata activadas son capaces a su vez de activar a los linfocitos T auxiliares inactivados (Th0), polarizando la respuesta inmune hacia un patrón Th1, Th2, Th9, Tfh,



**Figura 1.** Mecanismos generales de acción de los adyuvantes. La inmunidad innata está directamente relacionada con la estimulación de una respuesta inmune antígeno-específica. Diversos adyuvantes contienen componentes microbianos (PAMP) que se unen a TLR de membrana o NLR citosólicos en las CPA (señal 0), o pueden producir citólisis en el sitio de inoculación liberando moléculas endógenas (DAMP, del inglés: *Danger-Associated Molecular Patterns*) que también se unen a los TLR y NLR, conllevando a la activación de las CPA (tabla 1). Otros adyuvantes favorecen la presentación antigénica (señal 1) mediante el efecto depósito con reclutamiento de células dendríticas para su traslado a los linfonodos regionales. La activación de las CPA favorece la expresión de moléculas coestimuladoras de membrana o liberación de mediadores solubles (citocinas) que participan en la activación de los linfocitos T inactivados o Th0 (señal 2). Los linfocitos T, una vez activados, pueden polarizarse hacia un patrón que puede ser: Th1, Th2, Th9, Tfh, Th17, Th22 o Treg (tabla 2), y en esto el tipo de adyuvante es determinante.

Th17, Th22 o Treg, determinado por el perfil de citocinas que liberen y otros factores (tabla 2). Esta polarización depende de factores como el tipo de antígeno, la vía de inoculación y especialmente el adyuvante empleado, aunque todavía no se conocen con exactitud los mecanismos que inducen hacia uno u otro patrón<sup>22</sup>. Por ejemplo, se conoce que antígenos derivados de helmintos, las hifas de *Candida albicans*, la toxina colérica y otros, al igual que la vía mucosal, favorecen la polarización de la respuesta inmune hacia un patrón Th2, a menos que se empleen adyuvantes capaces de cambiar este patrón<sup>22,37</sup>. El hidróxido de aluminio y el MF59 son adyuvantes con efecto polarizador hacia Th2<sup>38,39</sup>, mientras que otros, como el monofosforil lípido A (MPL), derivado del LPS de *Salmonella minnesota*<sup>40</sup>, y los proteoliposomas de *Neisseria meningitidis B* polarizan hacia un patrón Th1<sup>21</sup>.

### Razones para utilizar adyuvantes en vacunas

Existen diversas razones para incorporar adyuvantes en vacunas, especialmente para uso en humanos: a) incrementar la respuesta inmune específica (seroconversión) en diversas poblaciones y lograr una efectiva protección contra diversas enfermedades, con especial interés en poblaciones con reducida capacidad de inmunorrespuesta, como ocurre en lactantes y ancianos, así como en personas inmunodeprimidas; b) facilitar el uso de menores cantidades de antígeno en una vacuna y así alcanzar una mayor cobertura de personas vacunadas, como ocurre durante pandemias como la influenza; c) también en este tipo de pandemias es importante lograr una protección más rápida de la población para reducir su propagación; d) reducir las dosis de vacunas, mejorando su aceptación por las personas, disminuyendo los requerimientos logísticos y mejorando el coste-beneficio, con un impacto de particular importancia en países subdesarrollados, y e) dirigir la respuesta inmune para lograr mecanismos más efectivos contra determinadas enfermedades; por ejemplo, respuestas Th1 en vacunas terapéuticas contra la alergia.

Un adyuvante «ideal» debería reunir un grupo de requisitos relacionados en la tabla 3<sup>41</sup>. Hasta hoy ningún adyuvante cumple con todas esas características, y es poco probable que se obtenga uno así, ya que existen factores que no dependen del adyuvante, sino

del antígeno y de la especie en la cual será utilizado. De todos los requisitos, el que tiene mayor importancia en vacunas profilácticas es la toxicidad, principal obstáculo para el avance de los nuevos candidatos a adyuvantes hacia fases avanzadas de estudios clínicos y su comercialización. A continuación se revisan las manifestaciones de toxicidad por los adyuvantes, reportadas tanto en fases experimentales como durante su uso clínico.

### Toxicidad de los adyuvantes

Además de la protección contra un microorganismo patógeno, la estimulación inducida por adyuvantes en el sistema inmune innato y/o específico puede propiciar también el desarrollo de reacciones tóxicas, debido a la liberación de mediadores biológicamente activos como las citocinas proinflamatorias, con efectos locales y sistémicos que van más allá del efecto deseado. Estas reacciones son inmunotóxicas por naturaleza, ya que tienen su origen en la estimulación del sistema inmune<sup>42</sup>.

#### Reacciones adversas locales

La inflamación local es la reacción más frecuente en el sitio de administración. Puede ser transitoria y leve o más duradera e intensa, manifestándose con dolor local y eritema hasta la formación de granulomas, quistes, abscesos, úlceras y necrosis<sup>43</sup>. Los hidrocarburos de cadenas cortas presentes en algunas emulsiones, como el ACF, producen un efecto detergente que disuelve la bicapa lipídica de la membrana celular causando lisis celular<sup>44</sup>. Un efecto citolítico similar lo producen las saponinas derivadas de *Quijilla saponaria* y sus fracciones purificadas<sup>29,30</sup>, así como el hidróxido de aluminio<sup>32,45</sup>. El efecto de depósito favorece la migración de células inmunocompetentes al sitio de inoculación y la liberación de citocinas proinflamatorias que incrementan el reclutamiento celular, asociado a edema y otros signos de toxicidad local, como manifestación de una respuesta de hipersensibilidad retardada, la cual es favorecida por sustancias no biodegradables, de alta viscosidad o con tamaños de partículas mayores de 10  $\mu\text{m}$  que dificultan el proceso fagocítico<sup>45-47</sup>.

**Tabla 1**

Ejemplos de adyuvantes y otros componentes microbianos que estimulan el sistema inmune por medio de su unión a PRR

PRR	Adyuvantes	Otros ligandos microbianos
<i>TLR</i>		
TLR1/TLR2	MDP Pam3Cys MALP2	Triacil-lipopéptidos ( <i>Neisseria</i> y micobacterias)
TLR2	MDP Peptidoglucano de BCG	Porinas, GPI-mucina, lipoproteínas, lipoarabinomanano, osfopolimananof, zymosan, $\alpha$ -glucano, glucoproteínas de envoltura de bacterias Gram+ y Gram-, <i>Micobacteria</i> , <i>Neisseria</i> , virus, protozoos y hongos)
TLR2/TLR6	MDP Pam2Cys	Diacil-lipopéptidos, ácido lipoteicoico. Micobacterias y bacterias Gram+
TLR3	Poly I:C	ds ARN
TLR4	LPS y análogos, MPLA E6020, Peptidoglucano de BCG Aminoalkyl-glucosaminide	Glucoproteínas de envoltura, glicoinositol, fosfolípidos, manano (bacterias Gram-, virus, protozoos, <i>Candida</i> )
TLR5	Flagelina bacteriana	
TLR7/TLR8	Resiquimod, imiquimod, 3M-019, R-848, 3M (compuesto 003)	ss ARN (virus de ARN)
TLR9	CpG	
<i>NLR</i>		
NOD1		Peptidoglucanos, ácido diaminopimético (bacterias Gram-)
NOD2	MDP	Peptidoglucanos, MDP (bacterias Gram- y Gram+)
NLRP1	MDP	MDP, toxina letal de <i>B. anthrax</i> . Bacterias Gram+ y Gram- y toxinas bacterianas
NLRP3	Adyuvantes de aluminio, quitosan, Quil-A, PLG, MDP, sílica	ARN, ADN, MDP, toxinas bacterianas
IPAF	Flagelina bacteriana	Flagelina bacteriana
<i>RLRs</i>		
RIG-1		ds ARN corto, 5TP-ARN (virus)
<i>Lectina tipo C</i>		
Dectina-1	$\beta$ -glucano (hongos)	$\alpha$ -manosa (hongos) glucolípidos (Micobacterias)
Mincle	TDM (factor cuerda)	
DC-SIGN	Glucomananos	N-acetilglucosamina, manano
MMR	Glucanos, dextranos, lentinas, glucomananos, galactomananos, Levans y xylanos	Manosa, fucosa (levadura)

BCG: bacilo de Calmette-Guerin; CpG: C fosfato G ADN; DC-SIGN: *dendritic cells-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*; dsARN: ácido ribonucleico de doble cadena; GPI: glucosilfosfatidilinositol; IPAF: *ice protease-activator factor*; LPS: lipopolisacárido; MALP-2: *macrophage activating lipopeptide-2*; MDP: muramildipéptido; MMR: receptor de manosa de macrófagos; MPLA: monofosforil lípido A; NLR: *nucleotide binding domain type receptor* (NOD); PLG: polilactide-cogluclúido; PRR: *pathogen recognition receptors*; RIG: *retinoic acid- inducible gene 1*; RLR: receptores tipo RIG; ssARN: ácido ribonucleico de cadena simple; TLR: receptores tipo toll.

Se conservaron la mayoría de las siglas en inglés por ser las que se reconocen internacionalmente. Los datos fueron ampliados y actualizados a partir de la referencia 36.

La reacción de Arthus se caracteriza por la formación de complejos inmunes inflamatorios entre los antígenos vacunales o el adyuvante y anticuerpos preexistentes o componentes del complemento. Esta es una de las razones por las cuales hay que tratar que los adyuvantes estimulen la respuesta inmune contra el antígeno pero no contra ellos mismos, ya que como estos deben ser utilizados reiteradamente, se corre el riesgo de causar una excesiva sensibilización en las personas inmunizadas. La reacción de Arthus a veces puede ser confundida con una hipersensibilidad retardada, ya que las manifestaciones clínicas locales son parecidas, pero a diferencia de este, su duración es más corta<sup>48</sup>.

La miofascitis macrofágica es una reacción rara que fue reportada por primera vez en Francia en 1998<sup>49</sup>, y en estudios posteriores se determinó que era causada por vacunas adyuvadas con hidróxido de aluminio<sup>50</sup>, lo cual generó mucho debate e investigaciones para confirmar esta teoría<sup>51,52</sup>. Esta reacción se describe como un infiltrado de macrófagos que contienen acumulaciones citoplasmáticas de cristales de aluminio, entre las fibras del músculo deltoides, y se asocia a otras manifestaciones sistémicas, como fatiga crónica y dolores musculares, en personas que han sido inmunizadas repetidamente con vacunas que contienen hidróxido de aluminio, tales como antihepatitis A (VHA), antihepatitis B (VHB) y toxoide tetánico<sup>53</sup>. Al parecer, la rareza de esta reacción está condicionada

**Tabla 2**

Diversificación fenotípica y funcional de linfocitos T auxiliares

	Th1	Th2	Th9	Tfh	Th17	Th22	Treg
Citocinas inductoras	IL-12	IL-4	TGF- $\beta$	IL-6, IL-21	IL-6, TGF- $\beta$ IL-21	IL-6 TNF	IL-2 TGF- $\beta$
Citocinas reforzadoras	IFN $\gamma$	IL-10?	?	?	IL-23	?	?
Factores de transcripción	Tbet Stat1, Stat2	GATA3 Stat6	IRF4	Bcl6	ROR $\gamma$ t Stat3	ROR $\gamma$ t AHR	FoxP3
Citocinas efectoras	IFN $\gamma$ TNF $\beta$	IL-4 IL-5 IL-13	IL-9	IL-14 IFN $\gamma$ IL-17	IL-17 IL-22	IL-22	IL-10 TGF- $\beta$

**Tabla 3**  
Características de un adyuvante «ideal»

1. Seguro, que no produzca eventos adversos inmediatos o a largo plazo
2. Bien definido desde el punto de vista químico
3. Bien definido en su mecanismo de acción
4. Biodegradable tras su administración
5. Químicamente estable en su envase por largo tiempo (al menos 2 años) y con pocas probabilidades de variaciones entre lotes
6. Capaz de desarrollar respuestas inmunes efectivas (alto porcentaje de protección) utilizando bajas concentraciones de antígenos, con pocas dosis y por diferentes vías de administración, incluyendo las mucosas
7. Elevada eficacia contra cualquier antígeno
8. De fácil preparación
9. De bajo costo

por una susceptibilidad genética que se ha asociado a personas que portan el gen HLA-DRB1\*01<sup>54</sup>.

Uno de los temas que más se debate en la actualidad es la posibilidad de que las vacunas aplicadas intranasalmente induzcan una parálisis del nervio facial conocida como parálisis de Bell, después del reporte de una significativa asociación entre la aplicación de NasalFlu (Berna Biotech), una vacuna suiza inactivada contra la influenza, que contiene virosomas y mutantes de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LTK63) como adyuvante, y 46 casos de parálisis de Bell<sup>55</sup>. 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. La expresión de gangliósidos GM1 en las neuronas sensoriales olfatorias podría ser una vía de entrada de enterotoxinas usadas como adyuvantes intranasales hacia el sistema nervioso central, produciendo una inflamación del nervio facial por un mecanismo aún poco conocido<sup>56</sup>.

Finalmente, existen reportes del desarrollo de tumores tipo sarcomas en el sitio de inoculación de vacunas adyuvadas, pero hasta la fecha solo se han observado en animales de compañía, fundamentalmente perros y gatos<sup>57</sup>. Afortunadamente, hasta hoy no existen reportes de este tipo en humanos.

#### Efectos tóxicos sistémicos

Son una consecuencia de la liberación masiva de citocinas proinflamatorias, que llegan a sitios distantes a través de la sangre<sup>4</sup>.

#### Respuesta de fase aguda

La inmunoestimulación farmacológica conlleva una serie de reacciones conocidas colectivamente como «respuesta de fase aguda» (RFA). Esta reacción incluye fiebre, cefalea, artralgia, mialgia, escalofríos y malestar general que aparece en las primeras horas después de la vacunación; el paciente se recupera en breve tiempo. La RFA se inicia cuando el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6, denominadas citocinas proinflamatorias, alcanzan niveles suficientes capaces de modificar las funciones fisiológicas distantes del sitio inductor<sup>58,59</sup>.

#### Síndrome de escape vascular

Es una reacción adversa seria observada tras la administración de IL-2 y otras citocinas<sup>60</sup>. Se caracteriza por un incremento de la permeabilidad vascular con extravasación de fluidos y proteínas, edema intersticial, hipotensión arterial, congestión pulmonar, anasarca en casos severos y fallo cardiovascular. La patogénesis del daño endotelial es compleja y pobremente comprendida, e involucra la activación o el daño de las células endoteliales causados por la liberación de citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , componentes del complemento y otros mediadores inflamatorios, la alteración en la interacción célula-célula y con el tejido conectivo. Este síndrome

constituye una limitación para el uso de citocinas como adyuvantes vacunales<sup>60,61</sup>.

#### Inducción o agravamiento de enfermedades autoinmunes

Existen evidencias experimentales de que un antígeno propio administrado con un adyuvante puede generar, en biomodelos animales sensibles, una enfermedad autoinmune. Incluso pequeños péptidos que tienen alguna similitud secuencial con estructuras propias, bajo determinadas condiciones experimentales, pueden inducir estos efectos<sup>62</sup>. También existen reportes de pacientes que han desarrollado enfermedades autoinmunes después de aplicar determinadas vacunas, sospechándose una relación causal<sup>63</sup>. En línea con este debate, recientemente se ha reportado una nueva entidad, denominada «síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvantes» (ASIA)<sup>64</sup>, que aún necesita ser validada por la comunidad científica<sup>65</sup>.

La aparición de una reacción autoinmune posvacunal es un fenómeno complejo que depende de factores genéticos, inmunológicos —como el mimetismo molecular entre estructuras antigénicas y propias—, una potente inmunoestimulación y otros factores concurrentes menos definidos<sup>66</sup>.

#### Alergia

Aunque algunos adyuvantes, como los compuestos de aluminio, inducen perfiles Th2, hasta la fecha no hay evidencias de reacciones alérgicas de importancia clínica<sup>38</sup>.

#### Modificación del metabolismo hepático

La biotransformación de fármacos por las enzimas del sistema citocromo P 450 (CYP) se inhibe por la acción de una respuesta inflamatoria y por la administración del bacilo de Calmette Guerin (BCG) y otras vacunas. Renton et al. 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, estos autores demostraron que la liberación de citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, TNF, TGF- $\beta$  e IFN, está involucrada en importantes modulaciones de la expresión de muchas isoformas de CYP<sup>67,68</sup>.

También se ha reportado un rápido decrecimiento en el contenido total de P450 en el hígado de ratas tratadas con FCA y la disminución selectiva de isoformas específicas de CYP, demostrado por disminución de los niveles de ARNm (CYP2B, CYP2C11, CYP3A1 y CYP2E1), contenido proteico (CYP2B, CYP2C11 y CYP2E1) o actividad catalítica (CYP2C6, CYP2C11 y CYP2E1). Estas modificaciones bioquímicas y metabólicas pueden tener consecuencias farmacocinéticas y farmacodinámicas cuando los fármacos que son aclarados en el hígado son administrados en conjunto con FCA y otros potentes inmunoestimuladores y vacunas<sup>69-71</sup>.

#### Inmunotoxicidad embrio-fetal

El balance de la respuesta Th1/Th2 influye en el embarazo, ya que la respuesta inmune materna tiene un perfil preferencial Th2 y una disminución del perfil Th1<sup>72</sup>. Se ha reportado que 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<sup>73</sup>, lo cual ha preocupado a las autoridades reguladoras. A pesar de esto, se necesitan nuevos estudios sobre la alteración del sistema inmune inducida por vacunas y adyuvantes en gestantes, asunto que requiere



especial atención por el incremento del uso de vacunas en mujeres en edad fértil<sup>74</sup>.

### Adyuvantes con registro sanitario para uso en vacunas humanas profilácticas

#### Compuestos de aluminio

Los 3 compuestos empleados son el hidróxido ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), el fosfato ( $\text{Al}_4(\text{OHPO}_4)_3$ ) y el sulfato fosfato ( $\text{Al}(\text{OHPO}_4)\text{SO}_4$ ) de aluminio, que pueden formularse con el antígeno durante el proceso de formación del gel o por adsorción del antígeno con el gel preformado<sup>38</sup>. El mecanismo de acción de los compuestos de aluminio dependen fundamentalmente del efecto de depósito<sup>38</sup> y de un efecto citolítico en el sitio de inoculación, con liberación de moléculas endógenas como ácido úrico y ADN que estimulan el inflammasoma Nalp3 como una vía importante en su acción adyuvante<sup>31,32,75</sup>.

A pesar de considerarse poco tóxico, este adyuvante produce inflamación local que puede llevar a la formación de granulomas<sup>45</sup>. Otros efectos que se han atribuido al hidróxido de aluminio son la miofascitis macrófaga<sup>49-55</sup> y otros trastornos autoinmunes<sup>76</sup>. En la actualidad, la polarización que induce hacia Th2 lo hace poco efectivo para muchas vacunas de nueva generación, lo cual ha estimulado la búsqueda de nuevos adyuvantes.

#### MF59

Es una nano-emulsión de aceite en agua que contiene un 4,3% del aceite biodegradable de escualeno, estabilizado por 2 surfactantes no iónicos: el Tween 80 y el Span 85 (sorbitan trioleate), con una fase continua de tampón citrato de baja fuerza iónica<sup>77</sup>. Este adyuvante interactúa con las CPA en el sitio de inoculación y participa en el traslado de los antígenos hacia los linfonodos regionales, aumentando la eficiencia de la presentación antigénica y estimulando una respuesta inmune significativa mediada por anticuerpos<sup>39</sup>. Los ensayos clínicos realizados han puesto en evidencia su escasa toxicidad en humanos<sup>77</sup>. Este adyuvante pertenece a la firma Novartis y se utiliza en vacunas contra la influenza H5N1 y H5N3, con la que se ha logrado una mayor protección en personas de edad avanzada<sup>2</sup>.

#### 3-O-desacyl-4-monophosphoryl lipid A

Se extrae del LPS de *S. minnesota* R595. Mantiene las propiedades inmunoestimulantes del LPS sin su toxicidad característica<sup>40</sup>. El 3-O-desacyl-4-monophosphoryl lipid A (MPL) es un agonista del TLR4 en las CPA y estimula la polarización hacia Th1<sup>78</sup>. Actualmente se estudia en numerosos ensayos clínicos en humanos y se emplea en diversas vacunas formando parte de los sistemas adyuvantes AS01, AS02 AS04, pertenecientes a la firma GlaxoSmithKline, y en forma sintética en el adyuvante RC529 de Berna Biotech, con el fin de mejorar las vacunas existentes y ampliar las posibilidades de uso contra nuevas enfermedades, tanto con fines profilácticos como terapéuticos<sup>79</sup>.

#### Adjuvant System 04 (AS04)

Es un adyuvante acuoso que contiene una combinación de 2 adyuvantes (50 µg de MPL y 500 µg de sales de aluminio) para la inducción de respuestas protectoras tanto humorales como celulares, con la activación de la inmunidad innata a través de TLR4<sup>80,81</sup> y un adecuado perfil de seguridad<sup>82</sup>. Actualmente se utiliza en la vacuna Cervarix<sup>TM</sup>, contra el papilomavirus humano HPV-16/18<sup>80,81</sup>, y en la FENDrix, contra el virus de la hepatitis B (HBV) para pacientes hemodializados<sup>83</sup>.

#### Adjuvant System 03 (AS03)

Es un nuevo adyuvante tipo emulsión aceite en agua que contiene 10,69 mg de escualeno, 11,86 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y 4,86 mg de polisorbato 80, también perteneciente a GlaxoSmithKline y empleado en la vacuna Pandemrix contra el virus de la influenza A/H1N1<sup>84</sup> y en la Prepandrix contra la influenza A/H5N1<sup>85</sup>.

#### Virosomas

Son liposomas que contienen componentes proteicos o lipídicos que forman parte de la envoltura de los virus. Estos pueden ser partículas pseudovirales o VLP (del inglés *viral-like particles*) o virosomas reconstituidos o IRIV (del inglés *immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*) formados por fosfolípidos, hema-glutinina del virus de la influenza y antígenos seleccionados<sup>86</sup>. Las partículas de IRIV tienen un tamaño promedio de 150 nm y mantienen la capacidad de penetrar las membranas tal y como lo hace el virus de la influenza; sin embargo, carece de la capacidad replicativa<sup>86,87</sup>. Los antígenos adsorbidos en la superficie de IRIV se internalizan y presentan por la vía endocítica dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II para la estimulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mientras que los antígenos localizados en el interior del IRIV pasan directamente al citosol y son presentados por la vía del CMH de clase I para la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>88</sup>. Actualmente se utilizan en la vacuna Epaxal<sup>TM</sup>, contra el virus de la hepatitis A, y en la Inflexal<sup>TM</sup>, contra la influenza<sup>5</sup>.

#### AFPLI<sup>®</sup>

Es un derivado de las vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, utilizado como el principal componente de la vacuna combinada VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> contra los serogrupos B y C. Se ha aplicado en más de 60 millones de dosis, principalmente en niños de Cuba y otros países de Latinoamérica, con la inducción de una elevada respuesta inmune protectora basada en un patrón Th1, con un excelente balance entre respuestas celulares y de anticuerpos, así como un buen nivel de seguridad<sup>6,21,89,90</sup>.

#### Fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )

Se ha utilizado para la vacuna triple bacteriana difteria-pertusis-tétanos (DPT) de Sanofi Pasteur<sup>6</sup>.

#### RC529

Es un análogo sintético de MPL<sup>91</sup> empleado en la vacuna Supravax<sup>TM6</sup>.

Existen otros adyuvantes en diferentes fases de ensayos clínicos, como Poliláctide coglicólido (PLG), Flagelina, adyuvantes de la familia Montanide, saponinas (QS21) y combinaciones de adyuvantes como AS01 (MPL + liposomas + QS21), AS02 (MPL + emulsión aceite/agua + QS21) e ISCOM (saponinas + colesterol + fosfolípidos), entre otros<sup>6,92</sup>.

### Del empirismo al diseño racional de adyuvantes

Desde que Glenny y Freund desarrollaron los primeros adyuvantes —el hidróxido de aluminio<sup>13</sup> y las emulsiones de Freund<sup>14</sup>, respectivamente—, hoy considerados de referencia para uso en vacunas humanas el primero y para la demostración de potencia y toxicidad el segundo, los adyuvantes se han obtenido de forma empírica en experimentos de ensayo y error, con muy poca base

científica, por lo que no es una sorpresa que no se conozca a ciencia cierta cómo funcionan la mayoría de ellos. Las crecientes exigencias de las agencias reguladoras y los avances más recientes alcanzados en la inmunología básica y la toxicología han propiciado que en la actualidad exista una tendencia al diseño racional de los candidatos a adyuvantes, lo cual permitirá lograr productos cada vez más eficaces y seguros.

Los últimos avances logrados en el conocimiento de los mecanismos de la inmunidad innata y su participación en la inducción de la inmunidad específica, particularmente la descripción de los PRR, sus ligandos y los eventos moleculares que conducen a la activación de señales intracelulares, constituyen hoy un pilar importante en el diseño de los adyuvantes<sup>93</sup>.

Como se refirió anteriormente, uno de los mecanismos que conducen a la toxicidad local es el efecto irritante directo del adyuvante, que causa lisis e inflamación local. Aunque este efecto puede ayudar a la inmuoestimulación mediante la liberación de señales de peligro de las células necróticas, el daño celular directo contribuye al desarrollo de considerables reacciones tóxicas locales. Así pues, evitar el uso de productos con efecto citolítico podría contribuir a reducir la toxicidad en el sitio de inoculación.

Aunque se considera que el efecto de depósito es un mecanismo importante de inmuoestimulación por adyuvantes, este efecto está asociado a reacciones de hipersensibilidad retardada<sup>43</sup>. La importancia del efecto de depósito como mecanismo de inmuoestimulación del hidróxido de aluminio fue cuestionada por Holt en 1950, quien demostró que la escisión quirúrgica del sitio de inoculación horas después de la inoculación no afecta la inducción de una respuesta inmune efectiva<sup>94</sup>. De igual modo se ha reportado que la adsorción del antígeno al hidróxido de aluminio no es necesaria para incrementar la respuesta humoral<sup>95</sup>. Así pues, el efecto de depósito puede ser modulado para lograr reducir la toxicidad local, empleando adyuvantes biodegradables y con tamaños de partículas muy pequeños, como las nanopartículas, que faciliten la rápida movilización del antígeno hacia los linfonodos locales<sup>96,97</sup>.

Los adyuvantes agonistas TLR se exploran actualmente en varias vacunas experimentales. Ellos inducen la liberación de citocinas proinflamatorias que reclutan células dendríticas y contribuyen a su maduración, pero influyen en la toxicidad local, por lo que, con un adecuado diseño de estos adyuvantes, es posible obtener un apropiado balance inmunogenicidad-toxicidad en vacunas humanas<sup>93,97,98</sup>. Existen evidencias de que la estimulación mediante los TLR genera una respuesta dependiente de MyD88, el cual, a través de NF- $\kappa$ B, induce la liberación de citocinas proinflamatorias; a su vez, también se estimula la vía TRIF, que favorece las señales coestimuladoras. Lograr la disección en la estimulación a través de TRIF y controlar la vía mediada por MyD88 (agonistas parciales) permitiría reducir la toxicidad, favoreciendo la inmunogenicidad<sup>93</sup>. Un adyuvante que al parecer ejerce este efecto es el MPL<sup>78</sup>.

Otra interesante propuesta para la reducción de la toxicidad de vacunas adyuvadas es la eliminación de epítopes que mimeticen con estructuras propias para evitar posibles reacciones de autoinmunidad<sup>99</sup>. Aunque esta estrategia puede contribuir a mejorar la seguridad de una vacuna específica, Bogdanos y Rigopoulou, basándose en sus estudios con el virus de la hepatitis C, consideran que con esta estrategia no siempre se puede conseguir reducir el riesgo de autoinmunidad<sup>100</sup>. La introducción de métodos bioinformáticos cada vez más sensibles y específicos puede ayudar en la identificación de mimetismo molecular, particularmente cuando se evalúan vacunas de péptidos para hacer comparaciones con secuencias propias con un riesgo potencial de inducción de autoinmunidad, teniendo en cuenta otros factores concurrentes, como la susceptibilidad genética<sup>101</sup>. Aún se requieren nuevas investigaciones que permitan avanzar en este promisorio campo.

## Conclusiones

A pesar de una experiencia de más de 70 años en el uso de adyuvantes, aún no se ha logrado una estrategia para un diseño racional capaz de lograr productos que combinen una alta eficacia con una nula o insignificante toxicidad. Aunque los últimos avances en la inmunología —en especial los relacionados con la inmunidad innata, su activación y cómo funciona— han permitido algunos avances, este sigue siendo uno de los mayores retos en el campo de las investigaciones en vacunas.

Aún existen problemas con la interpretación del papel de los adyuvantes en las formulaciones vacunales, y al ser la toxicidad el principal problema que ha limitado su uso clínico, paradójicamente las investigaciones toxicológicas son relativamente escasas en comparación con los estudios de eficacia, por lo que después de muchos años de costosas investigaciones, al final muchos productos evaluados no han podido aplicarse. Hoy existe una mayor conciencia de esta realidad, por lo que la aplicación de los nuevos conocimientos basados en los mecanismos de acción y toxicidad de los adyuvantes es imprescindible para obtener mejores resultados en el balance de eficacia y seguridad de las futuras vacunas humanas<sup>102,103</sup>. Este trabajo persigue estimular las investigaciones en este importante campo de la inmunología aplicada contemporánea.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28S:C25–36.
2. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33:492–503.
3. Vesikari T, Knuf M, Wutzler P, Karvonen A, Kieninger-Baum D, Schmitt HJ, et al. Oil-in-water emulsion adjuvant with influenza vaccine in young children. *N Engl J Med*. 2011;365:1406–16.
4. Behzad H, Huckriede AL, Haynes L, Gentleman B, Coyle K, Wilschut JC, et al. GLA-SE, a synthetic toll-like receptor 4 agonist, enhances T-cell responses to influenza vaccine in older adults. *J Infect Dis*. 2012;205:466–73.
5. Edelman R, Hardegree MC, Chedid L. Summary of an international symposium on potentiation of the immune response to vaccines. *J Infect Dis*. 1980;141:103–5.
6. Pérez O, Batista-Duharte A, González E, Zayas C, Balboa J, Cuello M, et al. Human prophylactic vaccine adjuvants and their essential role in new vaccine formulations. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45:681–92.
7. Heegaard PMH, Dedieu L, Johnson N, le Potier MF, Mockey M, Mutinelli F, et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Arch Virol*. 2011;156:183–202.
8. Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2006;24. S2/44-S2/45.
9. Hanly WC, Bennet TB, Artwohl JE. Overview of adjuvants. Information resources for adjuvants and antibody production. Comparison and alternative technologies. *AWIC Res Ser*. 1997;3:1–8.
10. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001;70:849–60.
11. Gad SC. A scheme for the prediction and ranking of relative potencies of dermal sensitizers based on data from several systems. *J Appl Toxicol*. 1988;8:361–8.
12. Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthérique. *Bull Soc Centr Med Vet*. 1925;101:227–34.
13. Glennly A, Pope C, Waddington H, Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*. 1926;29:31–40.
14. Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1937;37:509–13.
15. Johnson AG, Gaines S, Landy M. Studies on the O-antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1956;103:225–46.
16. Ellouz F, Adam A, Ciobaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;59:1317–25.
17. Edelman R. An update on vaccine adjuvants in clinical trials. *AIDS Res Hum Retr*. 1992;8:1409–11.
18. Jennings R, Simms JR, Heath AW. Adjuvants and delivery systems for viral vaccines—mechanisms and potential. En: Brown F, Haasheim LR, editors. *Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens*, Dev Biol Stand 92. Basel: Karger; 1998. p. 19–28.

19. Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:456–63.
20. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:727–35.
21. Pérez O, Laстре M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New vaccines require potent adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scand J Immunol.* 2007;66:271–7.
22. Schijns VE. Unraveling the immunologists dirty little secret. En: Schijns VE, O'Hagan DT, editores. *Immunopotentiators in modern vaccines.* 1st ed. USA: Elsevier Acad Press; 2006. p. 1–16.
23. Barr T, Carlring J, Heath AW. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine.* 2006;24:3399–407.
24. Hui G, Hashimoto C. The requirement of CD80, CD86, and ICAM-1 on the ability of adjuvant formulations to potentiate antibody responses to a *Plasmodium falciparum* blood-stage vaccine. *Vaccine.* 2007;25:8549–56.
25. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11:373–84.
26. Martinon F, Mayr A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Ann Rev Immunol.* 2009;27:229–65.
27. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
28. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Ann Rev Immunol.* 1994;12:991.
29. Yang Y, Wu C, Morrow W. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine.* 2004;22:1524–36.
30. Kensil C, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* cortex. *Int Immunol.* 1991;146:431–7.
31. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011;17:996–1002.
32. Marrack P, McKee A, Munks M. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:287–93.
33. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:77–84.
34. Dam TK, Brewer CF. Lectins as pattern recognition molecules: the effect of epitope density in innate immunity. *Glycobiology.* 2010;20:270–9.
35. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-1-like receptors signalling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:1–20.
36. Sierra González G, Tamargo Santos B. Aduvantes inmunológicos para vacunas humanas: estado actual, tendencias mundiales y en Cuba. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba.* 2011;1:1–32.
37. Lawson LB, Norton EB, Clements JD. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:414–20.
38. Lindblad EB. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. *Vaccine.* 2004;22:3658–68.
39. Calabro S, Tortoli M, Baudner B, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan D, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011;29:1812–23.
40. Baldrige JR, Crane RT. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods.* 1999;19:103–7.
41. Simon JK, Edelman E. Clinical evaluation of adjuvants. En: Schijns VE, O'Hagan DT, editores. *Immunopotentiators in Modern Vaccines.* 1st ed. USA: Elsevier Acad Press; 2006. p. 319–42.
42. Batista-Duharte A, Lindblad E, Oviedo E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol Lett.* 2011;203:97–105.
43. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants—A balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993;11:293–306.
44. Stewart-Tull DES. Freund-type mineral oil adjuvant emulsion. En: Stewart-Tull DES, editor. *The theory and practical application of adjuvants.* John Wiley & Sons Ltd; 1995. p. 1–19.
45. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine.* 1997;15:1364–71.
46. Leenaars PP, Koedam MA, Wester PW, Baumans V, Claassen E, Hendriksen CF. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Lab Animals.* 1998;32:387–406.
47. Ciocca DR, Frayssinet P, Cuello-Carrión FD. A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients. *Cell Stress Chaperones.* 2007;12:33–43.
48. Paiva CN, Arras RH, Magalhaes ES, Alves LS, Lessa LP, Silva MH, et al. Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction. *J Leukoc Biol.* 2009;85:855–61.
49. Gherardi RK, Coquet M, Chérin P. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *Lancet.* 1998;352:347–52.
50. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain.* 2001;124:1821–31.
51. Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groynne F, Sauzeat E. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine.* 2005;23:1359–67.
52. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, et al. Aluminium hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine.* 2004;22:3127–35.
53. Gherardi RK, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus.* 2012;21:184–218.
54. Guis S, Pellissier JF, Nicoli F, Reviron D, Mattei JP, Gherardi RK. HLA-DRB1\*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2535–7.
55. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 2004;350:896–903.
56. Fujihashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:2431–8.
57. Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol.* 2002;39:33–41.
58. Descotes J, Vial T. Flu-like syndrome and cytokines. En: House RV, Descotes J, editores. *Cytokines in Human Health. Immunotoxicology, Pathology, and Therapeutic Applications.* USA: Humana Press Inc.; 2007.
59. Gribble EJ, Sivakumar PV, Ponce RA, Hughes SD. Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Exp Opin Drug Metabol Toxicol.* 2007;3:209–34.
60. Damle NK, Doyle LV. 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.* 1989;142:2660–9.
61. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology.* 1997;37:117–32.
62. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* 1985;230:1043–5.
63. Batista-Duharte A. Vaccine and autoimmunity. A strange association under intense debate. *Rev Per Med Exp.* 2012;29:265–71.
64. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. ASIA — Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun.* 2011;36:4–8.
65. Meroni P. Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): Old truths and a new syndrome? *J Autoimmun.* 2011;36:1–3.
66. Waisbren BA. 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 Hypoth.* 2008;70:346–8.
67. Renton KW, Gray JD, Hall RI. Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination. *Can Med Assoc J.* 1980;123:288–90.
68. Renton KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2001;92:147–63.
69. Projean D, Lessard E, Ducharme P, Ducharme J. Use of Freund's Complete Adjuvant (FCA) in inflammatory pain models: Consequences on the metabolism and pharmacokinetics of the non-peptidic delta receptor agonist SNC80 in the rat. *Xenobiotica.* 2007;37:870–88.
70. Yang KH, Jung YS, Lee DY, Lee JH, Kim YC, Lee MG. 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.* 2008;36:811–5.
71. Batista Duharte A, Fong OL, Rodríguez JCT, Puente EZ, Pérez OM. Efecto del adyuvante vacunal AFCo1 intranasal sobre la concentración plasmática de teofilina en ratas. *MEDISAN.* 2012;16:1284–94.
72. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 1997;18:478–82.
73. Prater MR, Johnson VJ, Germolec DR, Luster MI, Holladay SD. Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice. *Vaccine.* 2006;24:263–71.
74. Verdier F, Barrow P, Burge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology.* 2003;185:213–9.
75. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor Jr W, Sutterwala FS, Falvell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 2008;453:1122–6.
76. Tomljenovic L, Shaw C. Mechanisms of aluminium adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. *Lupus.* 2012;21:223–30.
77. O'Hagan DT, Wack A, Podda A. MF59. Is a safe and potent vaccine adjuvant for flu vaccines in humans: what did we learn during its development? *Clin Pharmacol Ther.* 2007;6:740–4.
78. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science.* 2007;316:1628–32.
79. Garçon N, Chomez P, van Mechelen M. GlaxoSmithKline adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:723–39.
80. Garçon N. Preclinical development of AS04. En: Davies G, editor. *Vaccine Adjuvants.* Clifton, N.J.: Springer Science + Business Media; 2010. p. 15–27.
81. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminium salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183:6186–97.
82. Garçon N, Segal L, Tavares F, van Mechelen M. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development. The AS04 experience. *Vaccine.* 2011;29:4453–9.
83. Beran J. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8:235–47.



84. Carmona A, Omenaca F, Tejedor JC, Merino JM, Vaman T, Dieussaert I, et al. Immunogenicity and safety of AS03-adjuvanted 2009 influenza A H1N1 vaccine in children 6–35 months. *Vaccine*. 2010;28:5837–44.
85. Lasko B, Reich D, Madan A, Roman F, Li P, Vaughn D. Rapid immunization against H5N1: A randomized trial evaluating homologous and cross-reactive immune responses to AS03<sub>A</sub>. Adjuvanted vaccination in adults. *J Infect Dis*. 2011;204:574–81.
86. Gluck R, Burri KG, Metcalfe I. Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Curr Drug Deliv*. 2005;2:395–400.
87. Wilschut J. Influenza vaccines: the virosome concept. *Immunol Lett*. 2009;122:118–21.
88. Bungener L, Serre K, Bijl L, Leserman L, Wilschut J, Daemen T, et al. Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine*. 2002;20:2287–95.
89. Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Pérez A, Díaz M, Zayas C, et al. Long-lasting cellular immune response in babies, children, and pre-teenagers vaccinated with a proteoliposome based anti-meningococcal BC vaccine. *Inmunologia*. 2002;20:177–83.
90. Sotolongo F, Campa C, Casanueva V, Fajardo EM, Cuevas IE, Gonzalez N. Cuban Meningococcal BC Vaccine: experiences and contributions from 20 years of application. *MEDICC Rev*. 2007;9:16–22.
91. Tiberio L, Fletcher L, Eldridge JH, Duncan DD. Host factors impacting the innate response in humans to the candidate adjuvants RC529 and monophosphoryl lipid A. *Vaccine*. 2004;22:1515–23.
92. O'Hagan DT, de Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant – 'The long and winding road'. *Drug Discovery Today*. 2009;14:541–51.
93. Hauguel TM, Hackett CJ. Rationally-designed vaccine adjuvants: separating efficacy from toxicity. *Front Bioscience*. 2008;13:2806–13.
94. Holt LB. *Developments in Diphtheria Prophylaxis*. London, UK: Heinemann; 1950.
95. Iyer S, HogenEsch H, Hem SL. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine*. 2003;21:1219–23.
96. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007;25:1159–64.
97. Swartz MA, Hubbell JA, Reddy ST. Lymphatic drainage function and its immunological implications: From dendritic cell homing to vaccine design. *Sem Immunol*. 2008;147–56.
98. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:512–20.
99. Liu Y, Zhou W, You C, Zheng H, You H, Liu H, et al. An autoimmune domain-reduced HCV core gene remains effective in stimulating anti-core cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine*. 2006;24:1615–24.
100. Bogdanos DP, Rigopoulou EI. Self-mimicking autoimmune domains of hepatitis C virus core antigen. *Vaccine*. 2006;24:6173–4.
101. Poland GA. Vaccinomics and bioinformatics: Accelerants for the next golden age of vaccinology. *Vaccine*. 2010;28:3509–10.
102. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:310–5.
103. Slutter B, Hagens N, Jiskoot W. Rational design of nasal vaccines. *J Drug Target*. 2008;16:1–17.