



LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA,
FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LOS ADYUVANTES DE VACUNAS
MPLA Y QS-21 EN UN MODELO DE CO-CULTIVO CELULAR

Unidad de Investigación
Para optar al Título de Químico Farmacéutico

BENJAMIN IGNACIO RIQUELME DIAZ

Directora: Dra. Carolina Campos Estrada
JUNIO 2018

Dedicatoria.

A mi profesora Carolina Campos por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

I. RESUMEN

El interés en las vacunas adyuvantadas ha aumentado rápidamente debido al impacto de la vacunación en la salud pública. El desarrollo de vacunas en la actualidad está orientada a la prevención de patologías infecciosas, sino que también al tratamiento y cura de muchas patologías. Para ello se quiere mejorar considerablemente su eficacia, por lo que se incorporan en la formulación adyuvantes que puedan generar una potente respuesta inmunológica. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar nuevos adyuvantes o sistemas de adyuvantes muy potentes, pero a la vez seguros para usar en estas vacunas. Numerosos adyuvantes están actualmente sujetos a estudios y muchas de estas formulaciones incluyen QS-21 y MPL. Los principales inconvenientes en el desarrollo y aprobación de nuevos adyuvantes son los efectos secundarios no deseados, la falta de comprensión de su mecanismo, la seguridad desconocida en poblaciones especiales y el uso de modelos preclínicos con limitaciones en la predicción de efectos tóxicos.

En este trabajo utilizamos un modelo de co-cultivo de células HUVEC y PBMC para evaluar ambos adyuvantes y así obtener datos fisiológicamente relevantes. La viabilidad celular se evaluó mediante la incorporación de MTT. La inducción de la respuesta inmune se evaluó mediante, la adhesión de leucocitos y la activación de NFκB. Por último, la capacidad para generar inmunogenicidad fue evaluada por la liberación de citoquinas proinflamatorias. Los resultados indican citotoxicidad asociada principalmente al adyuvante QS-21 a altas concentraciones. Sin embargo, su potencia inflamatoria disminuye con la asociación de MPLA manteniendo la inmunogenicidad. Por lo tanto, encontrar una combinación óptima de MPLA/QS-21, para establecer el equilibrio entre eficacia y seguridad es clave para la aplicación clínica de estos adyuvantes. Finalmente, este modelo podría ser una alternativa al uso de animales de experimentación, evaluando de manera más precisa la respuesta inmune desencadenada por las vacunas adyuvantadas.

Palabras clave: *Adyuvante inmunológico, QS-21, Monofosforil lípido A, inflamación, reactogenicidad.*

II. ABSTRACT

The interest in adjuvant vaccine formulations has quickly increased due to high impact of vaccination on public health. Currently, the vaccine development is not only focused on the prevention of infectious diseases, but also to the treatment of several diseases. Therefore, we found improve its efficacy through the incorporation of adjuvants in the formulation, that they can generate a powerful immunological response. Consequently, there is a necessity to develop new adjuvants or adjuvant systems that are very powerful but safe to use in these vaccines. Several adjuvants are currently subject to studies and many of these formulations include QS-21 and MPL. The main disadvantages in the development and approval of new adjuvants are unwanted side effects, lack of understanding of their mechanism, unknown safety in special populations and the use of preclinical models with limitations in the prediction of toxic effects.

In this work we used a co-culture model of HUVEC cells and PBMC to evaluate both adjuvants and obtain physiologically relevant data. Cell viability was evaluated by the incorporation of MTT. The induction of the immune response was evaluated by means of the adhesion of leukocytes and the activation of NFκB. The ability to generate immunogenicity was evaluated by the release of pro inflammatory cytokines. These results indicate cytotoxicity of the majority of the adjuvant QS-21 at high concentrations. However, its inflammatory potency decreases with the association of MPLA maintaining immunogenicity. Therefore, finding an optimal combination of MPLA/QS-21, to establish the balance between safety and efficacy is the key to the clinical application of these adjuvants. Finally, this model could be alternative to the use of experimental animals, evaluating more precisely the immune response triggered by adjuvanted vaccines.

Keyword: *Adyuvant, QS-21, Monofosforil lipid A, inflammation, reactogenicity.*

III. ABREVIACIONES

MPLA: Monofosforil lípido A

TLR: Receptor tipo Toll

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

QS-21: Fracción 21 de *Quillaja saponaria*

LPS: Lipopolisacárido

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humana

TRIF: Adaptador que contiene el dominio Toll / IL-1R que induce IFN- β

MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88

NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

DMSO: Dimetilsulfóxido

IV. INDICE

1. INTRODUCCIÓN	- 5 -
1.1. Adyuvantes en la actualidad.	- 5 -
1.2. Regulación en el uso de adyuvantes.	- 6 -
1.3. Mecanismos de acción.....	- 9 -
1.4. Vía de señalización de NFkB.	- 13 -
1.5. Modelos de evaluación <i>in vitro</i>	- 15 -
2. OBJETIVOS	- 17 -
2.1. Objetivo General.	- 17 -
2.2. Objetivos Especificos.....	- 17 -
3. METODOLOGÍA	- 18 -
3.1. Diseño experimental	- 18 -
3.2. Metodología para la evaluación del efecto citotóxico por MPLA y QS-21.....	- 20 -
3.3. Metodología para la evaluación de la adhesión leucocitaria por MPLA y QS-21.....	- 20 -
3.4. Metodología para la evaluación de la activación NFkB como mecanismo de inmunogenicidad de MPLA y QS-21.....	- 21 -
3.5. Análisis estadístico.....	- 21 -
4. RESULTADOS.....	- 22 -
5. DISCUSIÓN	- 30 -
6. CONCLUSION.....	- 33 -
7. FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	- 34 -
8. BIBLIOGRAFIA	- 36 -

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas son una importante herramienta de salud pública para la prevención de enfermedades infecciosas, por lo que la seguridad de éstas es prioridad, ya que se administran en lactantes, niños, adultos mayores y poblaciones particulares. Las vacunas están compuestas de un principio activo que puede ser un antígeno atenuado o fracciones de éste, preservantes y adyuvantes, que, a su vez, pueden ser moléculas que favorecen la entrega o moléculas inmunomoduladoras.

El desarrollo de las vacunas adyuvantadas ha aumentado en los últimos años alcanzando etapas más avanzadas en su diseño y licenciamiento, proporcionando nuevas herramientas para cubrir las necesidades clínicas preventivas como también curativas. Sin embargo, muchos adyuvantes fallan durante el desarrollo del producto debido a diferentes factores como la capacidad de fabricación, estabilidad, falta de efectividad, niveles inaceptables de tolerabilidad o problemas de seguridad. En consecuencia, el uso de adyuvantes en las vacunas se ha convertido en un importante blanco de investigación para la farmacología y toxicología, puesto que hoy en día su desarrollo y eficacia son esenciales en la salud de la población, pero su seguridad está fuertemente cuestionada.

1.1. Adyuvantes en la actualidad.

El adyuvante más utilizado en las vacunas es el aluminio (sales de aluminio). Sin embargo, en las últimas décadas el uso de adyuvantes ha evolucionado hacia el diseño, extracción y síntesis de otras moléculas con actividad inmunogénica considerados como los nuevos adyuvantes. Algunos de estos son: emulsiones de aceite en agua (MF59, AS03 y AF03), virosomas y mezclas de monofosforil lípido A (MPLA) con sal de aluminio (AS04) y que recientemente han sido incorporados a nuevas vacunas humanas y animales licenciadas en Estados Unidos y Europa. Por otro lado existen algunos adyuvantes de origen natural que están en estudios preclínicos y clínicos como QS-21 (fracción 21 de *Quillaja saponaria*), que actualmente se están combinando con MPLA en sistemas de adyuvantes denominados AS01® y AS02®, pertenecientes a la compañía GlaxoSmithKline® (Garçon and Van Mechelen 2011).

El QS-21 es un glucósido triterpénico de tipo saponina extraída de la fracción 21 de las cortezas del árbol sudamericano *Quillaja saponaria Molina*. Este adyuvante promueve una respuesta inmune humoral, como también celular a través de las células T CD8+ citotóxicas (Newman et al. 1997). En la actualidad existe un alto grado de incertidumbre sobre su mecanismo, el cual estaría ligado a la activación del inflamasoma, a través del receptor NLRP3 (Marty-Roix et al. 2016). Varios estudios comparativos han demostrado que QS-21 supera significativamente a las otras clases de adyuvantes, incluidas las formulaciones con glucano, peptidoglicanos, nucleósidos bacterianos y lipopolisacáridos bacterianos, al aumentar las respuestas de anticuerpos y las respuestas de células T contra antígenos diana (Kensil et al. 1991; Ragupathi et al. 2011). Sin embargo, a pesar de su toxicidad y el efecto hemolítico indeseable aún permanecen para uso humano (Kensil et al. 1991; Sun, Xie, and Ye 2009; Ragupathi et al. 2011). Está claro que si las dosis más altas de este adyuvante se pueden usar con seguridad, su inmunogenicidad también aumentaría (Kensil et al. 1991; Ragupathi et al. 2011). De esta manera, los sistemas de adyuvantes asociados a QS-21 surgen como una forma de superar la toxicidad v/s potencia planteada anteriormente, inestabilidad química de QS-21 (Cleland et al. 1996) y su producción limitada (San Martin and Briones 1999).

Por otro lado, el MPLA es un derivado detoxificado del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria *Salmonella Minnesota* y tiene la capacidad de estimular la inmunidad innata a través de Toll-like receptor 4 (TLR4) (Baldrige et al. 2004). Entre las vacunas en desarrollo cuyas formulaciones incluyen los estos nuevos adyuvantes se pueden encontrar las vacunas contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), malaria, tuberculosis e influenza, como también vacunas para enfermedades como Alzheimer, algunos tipos de cáncer, entre otras (Garçon and Van Mechelen 2011).

1.2 Evaluación de eficacia y seguridad de vacunas adyuvantadas.

La introducción de un adyuvante en una nueva formulación de vacuna o una ya licenciada sigue siendo un reto y puede llevar varios años. Las consideraciones regulatorias para las vacunas adyuvantadas son similares a las de las vacunas sin adyuvantes, incluyendo algunas pruebas adicionales que son exclusivas para los nuevos adyuvantes.

Para apoyar la incorporación al mercado de una vacuna en estudio se recomiendan realizar distintos estudios de eficacia con el adyuvante y sin el adyuvante en la formulación.

Antes de su experimentación en seres humanos, las vacunas candidatas se someten a rigurosas pruebas en modelos animales previamente seleccionados (estudios preclínicos), lo que permite obtener información necesaria que justifique estudios más amplios en seres humanos, sin exponerlos a riesgos innecesarios. Las pruebas en animales tienen como objetivo comprobar la seguridad, tolerabilidad y la eficacia de la vacuna mediante diferentes estudios; entre los cuales se analiza la farmacocinética, el metabolismo, efectos pirogénicos, carcinogénicos, teratogénicos, reproductivos e inmunotóxicos (hipersensibilidad y autoinmunidad), además de los estudios que analicen la inmunogenicidad y capacidad protectora de la vacuna ante el agente infeccioso. (World Health Organization 2013). Estos últimos se determinan a través de parámetros humorales y celulares tales como producción de citoquinas, proliferación y fenotipificación de linfocitos, títulos de anticuerpos, isotipo, avidéz y actividad neutralizadora.

Luego de las pruebas preclínicas en animales, se inician los ensayos clínicos en seres humanos. Los estudios de fase I se determina inicialmente la seguridad y sus efectos biológicos, incluida la inmunogenicidad de la vacuna. Esta fase puede incluir estudios de dosis y vías de administración y generalmente involucra a menos de 100 voluntarios. Los estudios de fase II y III evalúan a un número mayor de sujetos donde se incluye a la población objetivo, y además se evalúan los valores límite de seguridad e inmunogenicidad. En la fase IV la formulación se somete a un seguimiento de seguridad post mercado para evaluar la eficacia y la seguridad a nivel epidemiológico (Goetz, Pfeleiderer, and Schneider 2010).

Pocos adyuvantes son aprobados, debido a que su alta toxicidad y mecanismo de acción pobremente comprendido como ocurre con QS-21. Además, otro fuerte cuestionamiento que ha surgido son los modelos experimentales utilizados, ya que se cree que los modelos animales no son representativos a las respuestas inmunológicas en los humanos por diferencias en cuanto a los patrones de expresión de receptores que participan en la respuesta inmune, por ejemplo, los Toll-like receptor (TLR) (figura 1), los que además presentan una gran variabilidad en su especificidad ante ligandos entre las diferentes

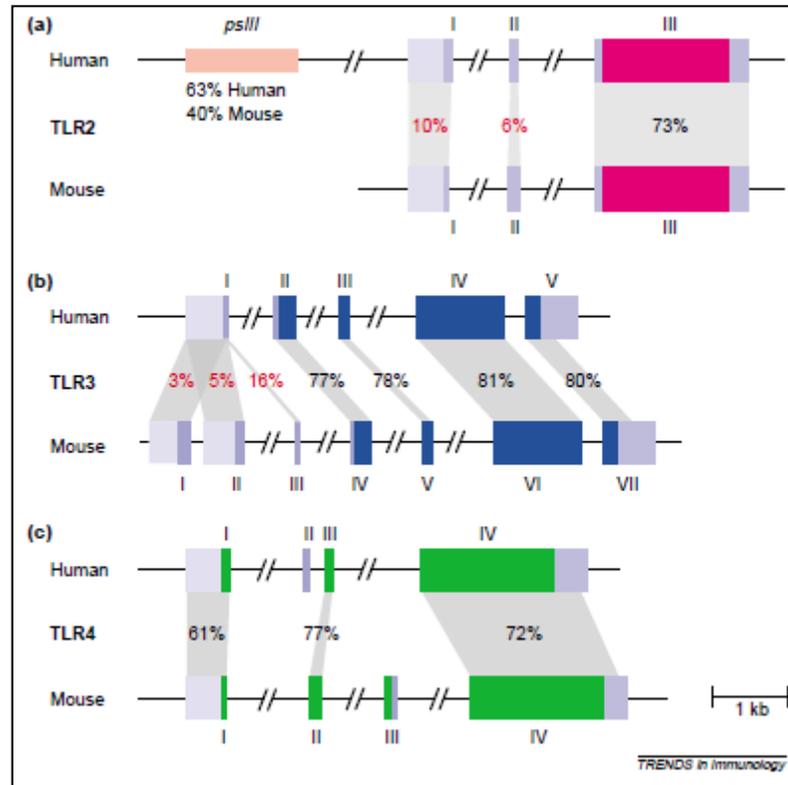


FIGURA 1. Estructuras de genes TLR humanos y murinos. Una comparación de las estructuras génicas de TLR2, 3 y 4 se muestra en a, b, y c. Las regiones promotoras proximales (gris claro) y los exones (secuencias no codificadoras: gris oscuro, secuencias codificantes: coloreadas) se muestran como recuadros. Las regiones de secuencia indicadas se compararon usando el algoritmo ClustalW. La similitud de secuencia se da como porcentaje de identidad entre especies. Tenga en cuenta que ambos genes TLR3 (b) contienen un intrón único que divide las secuencias de codificación del dominio TIR. Los exones 5' no codificantes, así como las regiones promotoras son diferentes en los dos ortólogos TLR2 (a) o TLR3 (b). Los transcritos de TLR3 se inician en el exón 1 y el exón 2, lo que sugiere la presencia de dos promotores alternativos. Las regiones promotoras proximales de ortólogos (c) de TLR4 son homólogas, sin embargo, ambos genes adquirieron diferentes exones adicionales (exón humano II, exón III de ratón), que están sujetos a corte y empalme alternativo. (Rehli 2002)

especies que los expresan. Por ejemplo, al comparar los TLR4 en ratón y en el ser humano se puede observar que en ratón el TLR4 es menos específico en su unión por los derivados del lípido A, a pesar de tener variaciones en el número y en la longitud de la cadena de acilo de lípido A. En cambio, los TLR4 en el ser humano poseen una mayor

especificidad relacionada con la estructura del lípido A (Fox et al. 2010; Hajjar et al. 2002; Kato et al. 2006; Steeghs et al. 2008).

A pesar de las diferencias según la especie animal, el agonista de TLR4 monofosforil lípido A fue el primer agonista de TLR4 aprobado para ser incorporado como adyuvante de vacunas. Otros ejemplos de estas variaciones se presentan en el receptor TLR8 el cual no se expresa en ratones (Hemmi et al. 2002) o el TLR9 que presenta diferencias en cuanto a expresión y especificidad (Klinman et al. 2004).

Un modelo animal más adecuado son los primates no humanos (NHP), los cuales son más similares a los seres humanos que los ratones con respecto al comportamiento de las células dendríticas (DC) y los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), por esto se consideran más útiles (Coffman, Sher, and Seder 2010). A pesar de esto, aunque los NHP pueden ser un puente útil entre roedores y humanos para la selección de adyuvantes, los ensayos clínicos comparativos de fase I en los que se comparan diferentes adyuvantes usando un solo antígeno siguen siendo la estrategia de predicción más confiable y, a menudo, la más rentable en la selección de adyuvantes de vacunas (Alving 2002).

Debido a estos antecedentes existe una necesidad de caracterizar de manera más exacta los mecanismos de acción mediante los cuales actúan estos adyuvantes permitiendo grandes mejoras en la modernización del uso de vacunas.

1.3 Mecanismos de acción

Para entender cómo funciona un adyuvante hay que entender cómo actúa el sistema inmune. El sistema inmune humano está compuesto por 2 subsistemas: la inmunidad innata y la adaptativa. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos que atraviesan las barreras físicas, está mediado tanto por células residentes en tejidos como macrófagos y DC, como también por células que circulan en sangre con capacidad fagocítica y liberadora de sustancias líticas como eosinófilos y basófilos. La inmunidad innata se activa frente a estímulos inespecíficos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que

interactúan con receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores se expresan en las células inmunes innatas y pueden ser clasificados en PRR endocíticos, señalamientos y secretados (Jeannin, Jaillon, and Delneste 2008). Entre los PRRs de señalamiento están los TLRs, receptores para dominios de oligomerización para la unión

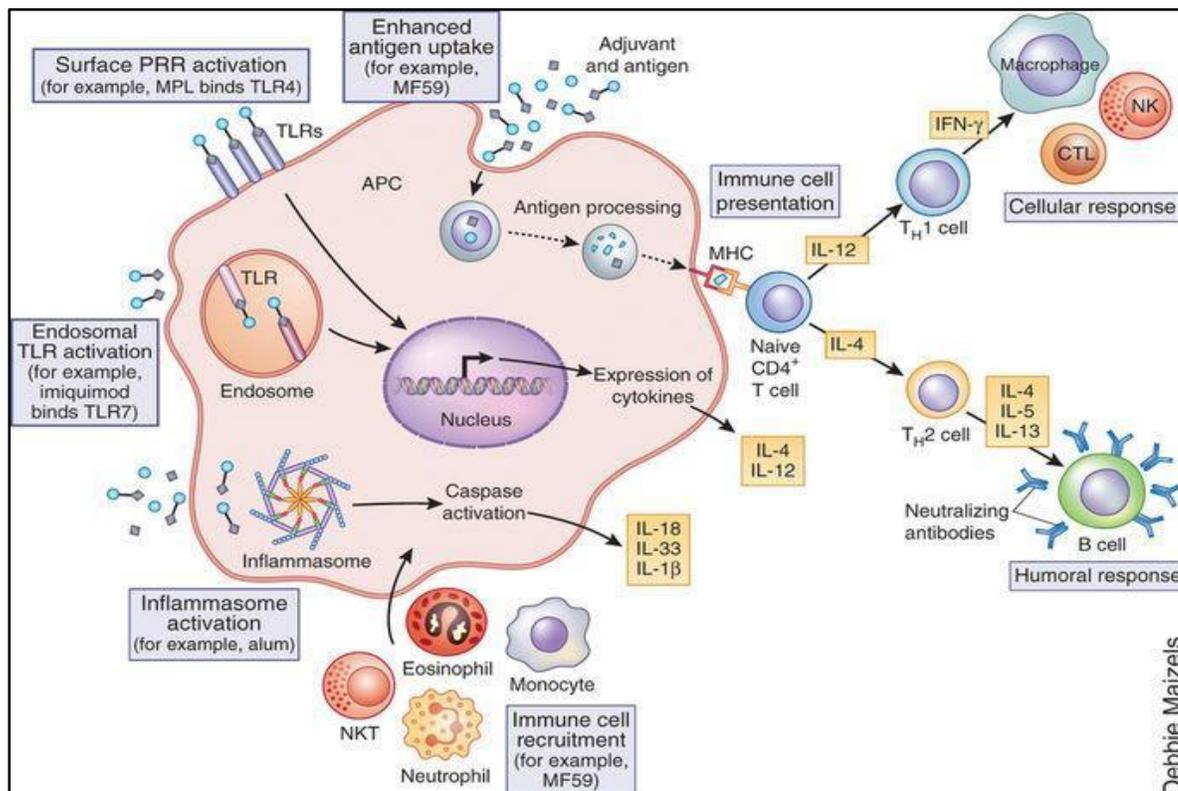


FIGURA 2. Mecanismos generales de los adyuvantes. Muchos adyuvantes pueden actuar como ligandos para los PRR que activan una respuesta inmune innata. La señalización del receptor puede activar factores de transcripción induciendo la síntesis de citoquinas y quimioquinas que ayudan a dirigir una respuesta inmune, como una respuesta de tipo TH1 o TH2, así como también influyen en las células inmunes que se reclutan en el sitio de la inyección. La activación del inflammasoma también se ha implicado como un mecanismo para algunos adyuvantes, su activación conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Algunos adyuvantes también influyen en la presentación del antígeno por MHC. Es posible que algunos adyuvantes puedan actuar a través de mecanismos múltiples, se ha sugerido que las sales de aluminio pueden afectar la captación de antígenos, la señalización de PRR, activación de inflammasomas y el reclutamiento de células inmunitarias (Reed, Orr, & Fox, 2013).

a nucleótidos o receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo genes inducibles-I de ácido retinoico (RIG-1) también conocido como DDX58 o receptores tipo RIG1 (RLRs) (Kawai and Akira 2009). Los TLRs o NLRs son de interés en la inmunización, ya que

tienen afinidad con adyuvantes y activan vías de señalización que modulan factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB), CREB o proteína activadora 1 (AP-1), que culminan con la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas u otros factores de transcripción (Vasou et al. 2017).

Estos eventos estimulan la captura del antígeno y maduración de las células presentadoras de antígenos (APC) que tiene como representante principal las DC. Paralelamente se establece el proceso inflamatorio y con ello algunos tipos de eventos adversos comunes como dolor y enrojecimiento de la zona, entre otros. La maduración de las APCs inicia el proceso de migración hacia los nódulos linfáticos en donde ocurre la presentación antigénica a las células linfocitarias T y B nativas, que junto a la liberación de citoquinas gatillan la diferenciación y proliferación de linfocitos, estableciendo la respuesta adquirida efectora y de memoria, esta última es primordial en la inmunización (Moser and Leo 2010).

La respuesta inmune adaptativa es impulsada por linfocitos T y B para generar una respuesta inmunitaria específica contra microorganismos, células tumorales o antígenos. Esta respuesta es mediada por la liberación de anticuerpos generados por linfocitos B, la capacidad citotóxica por linfocitos citotóxicos (CTL o CD8+) y el control de la respuesta inmune por los linfocitos T helper (Th o CD4+). Los Th se diferencian según estímulos citoquínicos generando diferentes perfiles linfocitarios como la respuesta Th1 mediada por la liberación de interleuquina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-γ) que estimulan la respuesta inmune citotóxica y fagocítica y con ello eliminación de patógenos intracelulares. La respuesta Th2 está mediada por interleuquina 4 (IL-4), su rol es estimular la inmunidad humoral y con ello la eliminación de parásitos extracelulares. Los mecanismos reguladores que inhiben las respuestas inmunes excesivas son mediados por linfocitos T reguladores (Treg) mediante la secreción de factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Además, TGF-β media la diferenciación de células Th17 junto con IL-6. La respuesta Th17 recluta neutrófilos hacia los sitios inflamatorios (Bonilla and Oettgen 2010).

Estos mecanismos inmunológicos son la base en la protección del hospedero y la vacunación busca imitar esta respuesta de forma controlada. Los adyuvantes como se

muestra en la figura 2 tienen como función potenciar la respuesta de inmunidad innata y con ello generar una respuesta capaz de dirigir la respuesta adaptativa hacia la inactivación y eliminación del patógeno específico (antígenos), seguido por el desarrollo de la memoria inmunológica; pero también pueden generar una respuesta inmunogénica exacerbada si se pierde el balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad, debido a la liberación de mediadores biológicamente activos como las citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta exagerada puede desencadenar eventos adversos locales y/o sistémicos con diferentes grados de severidad. En la actualidad, los adyuvantes han sido asociados a muchas de estas reacciones (Batista-duharte, Lindblad, and Oviedo-orta 2011). Por lo tanto, entender sus mecanismos pueden llevar a generar modulaciones de esta inmunotoxicidad.

La realización de pruebas en torno a los mecanismos tempranos del proceso inmunitario podría dilucidar el efecto biológico que generan los adyuvantes. Un ejemplo sería la adhesión celular, parte de la migración leucocitaria. Este proceso involucra 2 etapas de la migración: el *rolling* o rodamiento y la adhesión firme. El rodamiento está mediado por varias interacciones que necesitan activarse, que se dan entre moléculas de adhesión de células endoteliales denominadas selectinas y sus ligandos específicos en leucocitos como el ligando glicoproteína 1 de p-selectina (PSGL-1). La adhesión firme de los leucocitos al endotelio depende de la activación de las integrinas $\beta 2$, como el antígeno 1 de macrófagos (Mac-1) o el antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1) en la superficie de las células seguidas de la interacción con las proteínas de células endoteliales que pertenece a la superfamilia Ig como ICAM-1 (Adams and Shaw 1994).

Una vía interesante de estudiar que se encuentra involucrada en el proceso inmune es NF κ B, que tiene una estrecha relación y comunicación con otras vías de transducción intracelular o mediadores claves de estas rutas como la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), óxido nítrico (NO), la señalización de Notch y TLR, entre otras. Su relación con vías relacionadas a PRR generan una posible relación con los mecanismos de adyuvantes como QS-21.

1.4 Vía de señalización de NFκB.

La cascada de señalización NFκB, es una de las principales vías proinflamatorias en macrófagos y células endoteliales. La familia del factor de transcripción NFκB en mamíferos consta de cinco proteínas, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105 / p50 (NFκB1) y p100/52 (NFκB2) que se asocian entre sí para formar distintos complejos homo y heterodiméricos transcripcionalmente activos. Todos ellos comparten un dominio de homología de Rel (RHD) amino terminal conservado de 300 aminoácidos de longitud (Ghosh et al. 1995). Están estrechamente controlados por una familia de moléculas inhibitoras (IκB) que comprende IκBa, IκBb e IκBe, y las moléculas precursoras para p50 y p52, p105 y p100, respectivamente. En las células en reposo, NFκB está inactivo debido a su asociación con las proteínas IκB. De este modo NFκB se retiene en el citoplasma y se evita la unión al ADN. Tras la señalización de citoquinas, respuesta inmune innata o adaptativa o estrés ambiental se inicia la activación de NFκB. Las vías de señalización convergen en un complejo quinasa llamado IKK. El complejo IKK consiste en dos subunidades de quinasas, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2), y una subunidad reguladora IKKγ (NEMO). En los últimos años, ha quedado claro que existen al menos dos vías separadas para la activación de NFκB (figura 3). La vía "canónica" es desencadenada por productos microbianos y citoquinas proinflamatorias tales como TNFα e IL-1 como se describió anteriormente, lo que generalmente conduce a la activación de complejos que contienen RelA o cRel (Karin and Ben-Neriah 2000). La vía "alternativa" es activada por las citoquinas de la familia TNF-linfotoxina β (TNFSF3) ligando CD40 (CD40L y TNFSF5), factor de activación de células B (Bonffi y TNFSF13B) y activador del receptor del ligando NFκB (RANKL y TNFSF11), lo que resulta en la activación de los complejos RelB / p52 (Bonizzi and Karin 2004). Estas rutas se caracterizan por el requisito diferencial para las subunidades IKK. IKKβ regula la activación de la vía canónica a través de la fosforilación de IκBs y requiere la subunidad IKKγ pero no IKKα (Zandi et al. 1997). Se requiere IKKα para la activación de la ruta alternativa a través de la fosforilación y procesamiento de p100, el precursor de p52 (Senftleben 2001), y esto es independiente tanto de IKKβ como de IKKγ (Ghosh and Karin 2002).

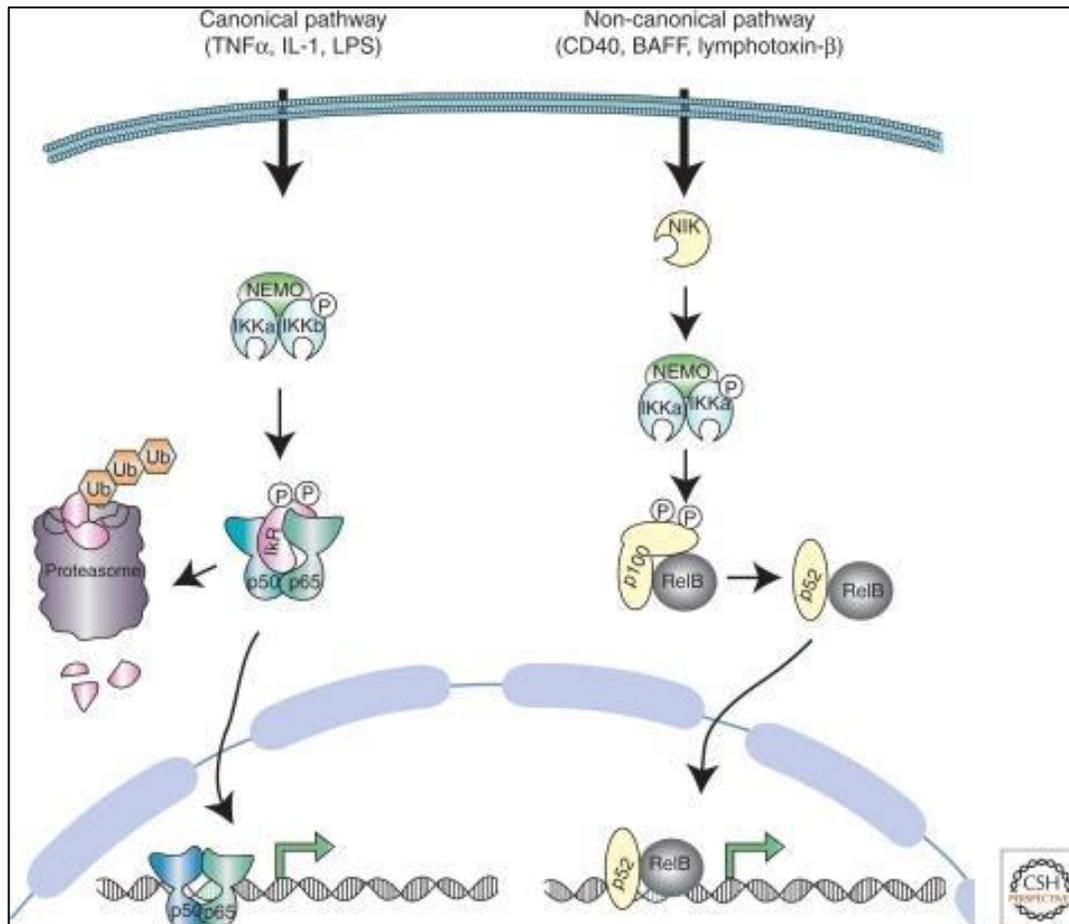


FIGURA 3. Señalización canónica y no canónica a NFκB. La ruta canónica es, por ejemplo, inducida por TNFα, IL-1 o LPS y utiliza una gran variedad de adaptadores de señalización para activar la actividad de IKK. La fosforilación de residuos de serina en la región sensible a la señal (SRR) de los IκB clásicos por IKKβ conduce a la ubiquitinación de IκB y a la posterior degradación proteosómica. Esto da como resultado la liberación del dímero NFκB, que luego puede translocarse al núcleo e inducir la transcripción de genes diana. La ruta no canónica depende de la activación de IKKα inducida por NIK (NFκB-inducing kinase). IKKα fosforila la subunidad p100 NFκB, que conduce al procesamiento proteosómico de p100 a p52. Esto da como resultado la activación de los dímeros p52-RelB, que se dirigen a elementos κB específicos. (Oeckinghaus & Ghosh, 2009)

La forma más frecuente de la activación de NFκB en la señalización de TLR es un heterodímero compuesto por RelA y p50. Como sabemos, la activación de la vía TLR es la más involucrada en los mecanismos de los adyuvantes modernos, por lo tanto, como uno de los mediadores de su respuesta es NFκB, la evaluación de este factor de

transcripción ayudaría a entender los mecanismos inmunogénica y de los adyuvantes MPLA y QS-21.

Actualmente, los mecanismos de toxicidad no están completamente dilucidados, hay resultados poco concluyentes con los métodos de evaluación que generan controversias e inquietudes en relación con la seguridad de las vacunas, y a su vez la necesidad de comprender mejor los mecanismos involucrados en los efectos tóxicos no sólo a corto plazo si no que también en una respuesta más tardía (Batista-Duarte et al. 2014). Sin embargo, la principal limitante es trasladar datos observados en modelos animales a humanos, por lo tanto, seleccionar un apropiado modelo preclínico de evaluación de eficacia y seguridad es esencial para el desarrollo de nuevos adyuvantes de vacunas, ya que hoy en día existen muchos adyuvantes en fase clínica con antecedentes preclínicos en modelos no adecuados. Por otro lado, es importante que las líneas de investigación implementen modelos alternativos al uso de animales de experimentación.

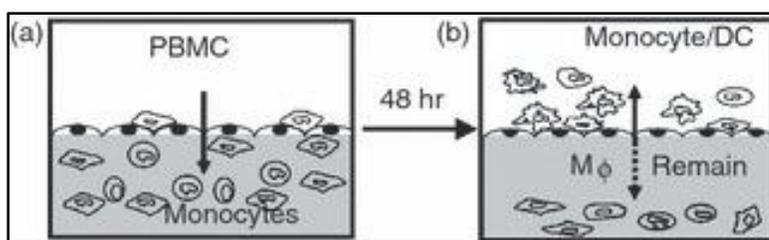


FIGURA 4. El esquema del modelo *in vitro* equivalente de tejido periférico (PTE). El PTE es un sistema de cultivo tridimensional que consiste en una monocapa confluyente de células endoteliales no estimuladas cultivadas sobre una matriz de colágeno libre de endotoxinas. Cuando se aplican células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sobre HUVEC, los monocitos migran al colágeno subendotelial (Ma et al., 2010).

1.5 Modelos de evaluación *in vitro*

Para replicar todo el proceso mencionado se requiere la generación de modelos de pruebas preclínicas lo más similares al proceso fisiológico de inmunización, en el cual se produce una migración de la fracción monocítica de PBMC como también de neutrófilos hacia la zona de inyección y posteriormente la transmigración reversa de las DC a los nódulos linfáticos aferentes en donde interactúan con la matriz extracelular y con el revestimiento endotelial de los vasos linfáticos.

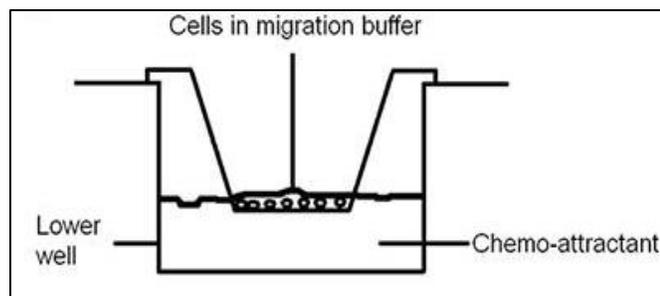


FIGURA 5. El esquema del modelo Transwell®. Es un ensayo de invasión y migración celular, en este caso el tejido endotelial se siembra encima de un pocillo con fondo poroso que es ajustable arriba de otro los pocillos de una placa (Justus, Leffler, Ruiz-Echevarria, & Yang, 2014)

Los modelos experimentales como el *in vitro* equivalente de tejido periférico (PTE) o Transwell® (transwell migration assay) tienen utilidad en esta representación en donde los elementos claves son la generación de una barrera permeable formada por tejido endotelial, principalmente por células HUVEC. En ambos se imita el proceso de migración a través del endotelio como se puede ver en las figuras 4 y 5.

Por otro lado, es importante que las líneas de investigación implementen modelos alternativos al uso de animales de experimentación siguiendo la regla de las 3 erres (Russell y Burch, 1959), es decir, que faciliten el **R**eemplazo de animales de experimentación en la evaluación de toxicidad, permitan una **R**edución del número de animales utilizados o incorporan un **R**efinamiento del diseño de estudio para disminuir el estrés sobre el animal. La principal ventaja de los métodos alternativos radica en las consideraciones éticas siendo lo más importante cuando se planifica un proyecto, ya que se debe evaluar la relación costo-beneficio en función del dolor o malestar ocasionado a los animales, otra importante ventaja es que las sustancias en estudio actúan directamente sobre las dianas biológicas por tanto se evita la interferencia de la respuesta total del organismo, por ende, cualquier cambio o mejora en los procedimientos que facilite el cumplimiento de las tres Rs va a suponer un avance en los modelos alternativos como lo define *UK National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs, 2011). Por consiguiente, este es el fundamento por el cual se decide realizar una técnica *in vitro* que permite reemplazar el uso de animales de experimentación y utilizar cultivos celulares primarios humanos que son más representativos de la respuesta inmune en un individuo en comparación con animales, y además nosotros proponemos implementar un modelo de co-cultivo celular humano que

imita la comunicación celular entre leucocitos y endotelio humano, que son los protagonistas de la respuesta inmune que desencadena la inflamación.

Estos antecedentes demuestran que existen un gran interés en determinar cómo diferentes formulaciones de adyuvantes como MPLA y QS-21 alteran la señalización molecular, y demostrar sus diferentes mecanismos involucrados que aún no están claros (Reed, Orr, and Fox 2013) siendo adyuvantes presentes en vacunas que están en fases clínicas y algunas en comercialización en Chile. En esta unidad de investigación se propone evaluar la citotoxicidad de QS-21, MPLA y sus combinaciones; la capacidad para estimular el proceso de adhesión leucocitaria y la activación de NFκB, en base a un diseño experimental con diferentes condiciones utilizando como base un modelo de co-cultivo entre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

2. OBJETIVOS

2.1 **Objetivo General.**

- Evaluar el mecanismo y la respuesta inmune generada por los adyuvantes inmunológicos MPLA y QS-21 en un modelo de co-cultivo de HUVEC-PBMC para caracterizar la inmunotoxicidad y mecanismo involucrado.

2.2 **Objetivos Específicos.**

- Evaluar el efecto citotóxico de MPLA y QS-21 solos y en combinación en el modelo de co-cultivo HUVEC-PBMC.
- Evaluar el efecto de MPLA y QS-21 solos y en combinación sobre la adhesión leucocito-endotelio.
- Evaluar la activación de NFκB como mecanismo de inmunogenicidad de los adyuvantes MPLA y QS-21.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño experimental

Los modelos utilizados fueron cultivos y co-cultivos de HUVEC y PBMC. La placa a utilizar y la cantidad de pocillos sembrados fue determinada según la cantidad y replicación que se requirió para cada experimento. Para el cultivo de HUVEC se utilizaron placas de fondo plano. A estas se les realizó un tratamiento con 100 μ L gelatina o 50 μ L de Geltrex® añadidas directamente en los pocillos y con una posterior incubación a 37°C por una hora para la generación de una lámina en la base de estos que permita la adhesión de las HUVEC. Se usaron 2×10^4 células por pocillo. Para los cultivos de PBMC se utilizaron placas sin tratar de fondo plano, se añadieron 1×10^5 células y luego se agregaron las condiciones disueltas en medio RPMI (figura 5).

En los co-cultivos se sembraron 2×10^4 células HUVEC por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por aproximadamente 12 horas. Luego se agregaron diferentes condiciones. Pasado el tiempo de incubación con las condiciones se agregaron 1×10^5 células PBMC. Las condiciones y tiempo de exposición a las condiciones de todos los experimentos se muestran en la tabla 1.

TABLA 1. Resumen de condiciones, experimentos y tiempos por modelo a utilizar			
MODELO	CONDICIONES	EXPERIMENTOS	TIEMPO
HUVEC	Control (+): TNF α 10-50 ng/mL; LPS 10-50 ng/mL Control (-): M199 sin suero o con DMSO 0,03% MPLA (M en figuras): 1 y 2 μ g/ml QS-21(Q en figuras): 1, 2, 5* 10* μ g/ml <i>*solo para MTT</i> MPLA/QS-21 (MQ en figuras): 1/2; 2/1; 1/1 y 2/2 μ g/ml	MTT	24 horas
PBMC	Control (+): TNF α 10-50 ng/mL; LPS 10-50 ng/mL Control (-): M199 sin suero o con DMSO 0,03% MPLA: 1 y 2 μ g/ml QS-21: 1, 2, 5* 10* μ g/ml <i>*solo para MTT</i> MPLA/QS-21: 1/2; 2/1; 1/1 y 2/2 μ g/ml	MTT	24 horas
CO-CULTIVO	Control (+): TNF α 10-50 ng/mL; LPS 10-50 ng/mL Control (-): M199 sin suero o con DMSO 0,03% MPLA: 1 y 2 μ g/ml QS-21: 1, 2, 5* 10* μ g/ml <i>*solo para MTT</i> MPLA/QS-21: 1/2; 2/1; 1/1 y 2/2 μ g/ml	MTT; Adhesión HUVEC -PBMC; Activación NF κ B	24;24; 3 horas respectivamente

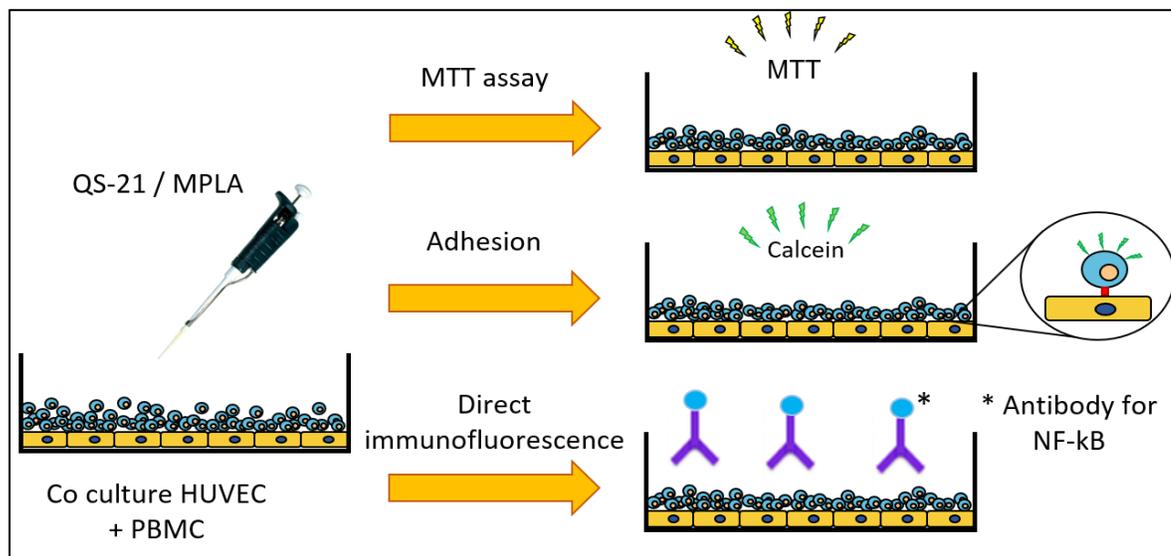


FIGURA 6. Esquema del diseño experimental (elaboración propia).

Reactivos: QS-21 se obtuvo de Desert King (San Diego, CA) y MPLA a InvoGen (San Diego, CA). Para los controles, LPS y dexametasona se obtuvieron en Sigma (Saint Lois, MO) y $\text{TNF}\alpha$, Geltrex® y la gelatina fueron obtenidos de Gibco™ Invitrogen (Carlsbad, CA).

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), (Cascade Biologics™ Invitrogen cell culture, Carlsbad, CA), se obtuvieron de cultivo primario que expresan el factor de Von Willebrand (vWf), el antígeno CD31, y son negativas para micoplasma, hepatitis B, hepatitis C, y virus de HIV-1. Las células se cultivaron en monocapa con Medio 199 (M199 Cascade Biologics™ Invitrogen cell culture, Carlsbad, CA) con SFB y con suplemento de crecimiento bajo en suero (LSGS) (Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, CA), en un ambiente con 5% de CO_2 y con antibióticos (penicilina/estrepmicina) (Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, fueron co-cultivadas con PBMC para la realización de diferentes modelos de co-cultivo.

Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC): Estas células de cultivo primario de donantes sanos fueron obtenidas de Sigma-Aldrich™ (Saint Lois, MO). Las células se cultivaron con medio RPMI 1640 (Biological Industries, Israel), en un ambiente con 5% de CO_2 y con antibióticos (penicilina/estrepmicina) (Gibco™, Invitrogen, Carlsbad,

CA). Posteriormente, fueron co-cultivadas con HUVEC para la realización de diferentes modelos de co-cultivo.

3.2 Metodología para la evaluación del efecto citotóxico de MPLA y QS-21 solos y en combinación en el modelo de co-cultivo HUVEC-PBMC.

La viabilidad de las células antes las condiciones se determinaron mediante el ensayo MTT Tetrazolium (Molecular Probes Inc, Invitrogen, Oregon). Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en un producto químico llamado formazan de color púrpura con un máximo de absorbancia cercano a 570 nm. Se agregó el MTT a una concentración final por pocillo de 0,5 mg/mL. Luego las placas de 96 de pocillos fueron incubadas por 2 horas a 37°C. Luego de las 2 horas se agregaron 100 uL de la solución de solubilización SDS y se incubó toda la noche a 37°C, para su posterior medición en un lector de microplacas a 570 nm. Las mediciones se realizaron en el equipo Varioskan Flash (Thermo Scientific Inc, USA). La absorbancia obtenida es directamente proporcional al número de células viables por pocillo las cuales y se relativizó en porcentajes.

3.3 Metodología para la evaluación de la adhesión leucocitaria por MPLA y QS-21.

Ensayo de adhesión celular: La adhesión de PBMC a monocapa de HUVEC fue evaluada como se fue descrito previamente (Che et al. 2002; Kim et al. 2004). Las células HUVEC se sembraron según el protocolo de co-cultivo HUVEC-PBMC descrito anteriormente. Luego de aproximadamente un día se agregaron las condiciones a 24 horas. Previamente al término de la incubación de las células HUVEC con las condiciones, las células PBMC fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI y luego fueron lavadas con PBS. Luego, las células fueron resuspendidas en medio M-199 sin suero a una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Posterior a esto se agregó calceína (Molecular Probes Inc, Invitrogen, Oregon) a una concentración de 5 μ L/mL a la suspensión y se incubó en oscuridad por 30 minutos a 37°C. La suspensión de células con calceína fue centrifugada y resuspendida nuevamente para obtener una relación celular de 2×10^5 en el mismo medio y se añadió 100 μ L a los pocillos con las monocapas de HUVEC y enseguida se incubó durante aproximadamente 1 hora a 37°C.

La fluorescencia fue cuantificada utilizando un lector de microplaca a 492/517 nm de

excitación/emisión, donde la fluorescencia es proporcional al número de células PBMC por pocillo. Las mediciones fueron realizadas en el equipo Varioskan Flash (Thermo Scientific Inc, USA). Luego se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y se le agregaron 200 μ L de PBS y nuevamente se cuantificó la fluorescencia. Finalmente se calculó el porcentaje de adherencia y la adherencia relativa por pocillo.

3.4 Metodología para la evaluación de la activación NF κ B como mecanismo de inmunogenicidad de MPLA y QS-21.

Detección de localización nuclear de NF κ B por microscopia confocal: Las células se sembraron según el protocolo de co-cultivo HUVEC-PBMC descrito anteriormente. Posteriormente las células se fijaron en tampón de fosfato de formaldehído al 3,7%- 0,1 M (pH 7,3) o metanol a -20°C durante 15 minutos. Luego se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton-X100 al 0,3%. Las células se bloquearon con albúmina de suero bovino al 3% durante 1 hora. Luego, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de conejo Anti-p65 humana (subunidad del complejo de NF κ B) conjugado a un anticuerpo secundario con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:50, ab204263, Abcam, Cambridge, Reino Unido). La incubación con el anticuerpo se realizó a 4°C toda la noche. Finalmente, los núcleos fueron teñidos con el marcador nuclear DAPI (ab104139, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 5 minutos. Se obtuvieron fotografías con un microscopio confocal Nikon D-Eclipse C1 (Lasers: 408, 488 y 543) a 60x y 100x por cada condición experimental de tres experimentos independientes. La intensidad de fluorescencia relativa entre el núcleo:citoplasma fue cuantificada a partir de las imágenes analizadas con el software ImageJ 1.47v.

3.5 Análisis estadístico

Fue considerado estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. En primer lugar, se aplicó un ensayo preliminar para calcular la distribución normal de datos utilizando el análisis de D'Agostino-Pearsons. Los datos se representaron como la media \pm DE de n calculada previamente. Si la distribución de datos tuvo un comportamiento normal, se aplicó un análisis ANOVA de una o dos vías con los *post-test* de Tukey's para comparar el efecto de los diferentes adyuvantes y sus combinaciones con los respectivos controles no tratados, así como para evaluar el impacto que tiene las combinaciones vs el uso

individual. Por el contrario, si los datos no mostraban una distribución normal se aplicaron estadísticas no paramétricas. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPadPrism v7.

4. RESULTADOS

El ensayo MTT se utilizó para evaluar y obtener las dosis menos citotóxicas a utilizar en los ensayos posteriores. Para determinar el comportamiento en la citotoxicidad de los adyuvantes a medida que aumenta su concentración, se generaron curvas a diferentes concentraciones de ambos adyuvantes frente a las líneas celulares por separado y en conjunto como se puede ver en la figura 7.

En el caso de los controles negativo y de vehículo, ninguno presentó un grado de citotoxicidad significativamente estadístico como se muestra en la figura suplementaria 1. Además, se realizaron controles con las condiciones positivas para la estimulación de la respuesta inflamatoria, en este caso LPS y TNF α que tampoco demostraron ser citotóxicos a las concentraciones utilizadas. La adición de los adyuvantes disminuyó significativamente la viabilidad a medida que las concentraciones de estos fueron aumentando como se puede ver en la figura 7 A. En el caso de QS-21 las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fueron las que más causaron citotoxicidad, en HUVEC y PBMC por separado y en conjunto. En el caso de las combinaciones de adyuvantes, estas generaron menor grado de citotoxicidad como se muestra en la figura 8.

Es importante destacar que se observó una diferencia en la susceptibilidad de los modelos aislados en comparación al modelo de co-cultivo, al parecer complejizar el mólo logra menor respuesta citotóxica.

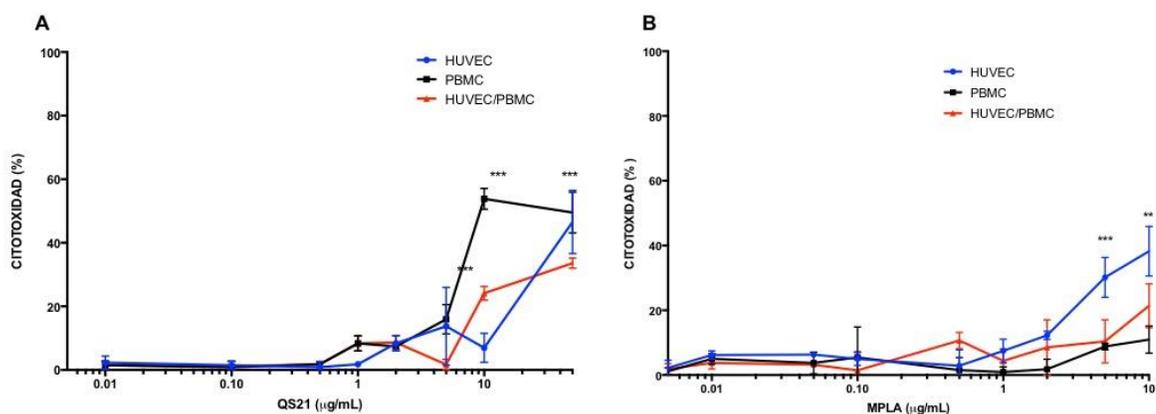


FIGURA 7. Evaluación de la citotoxicidad a 24 horas por el ensayo de MTT. Células HUVEC, PBMC y ambas en co-cultivo fueron incubadas a diferentes concentraciones de **A)** QS-21 y **B)** MPLA durante 24 horas. Luego la formación de sales de formazan fue determinada a 540 nm. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DS con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 2-vías con un post test de Tukey's para multicomparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

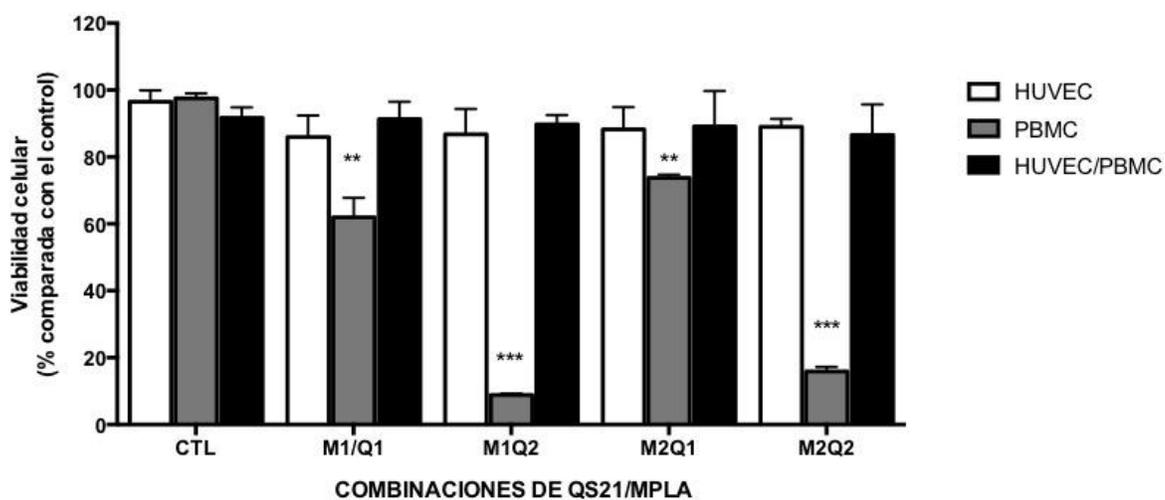


FIGURA 8. Evaluación de la citotoxicidad a 24 horas por el ensayo de MTT. Células HUVEC, PBMC y ambas en co-cultivo fueron incubadas a diferentes concentraciones de las combinaciones de QS-21 y MPLA durante 24 horas. Luego la formación de sales de formazan fue determinada a 540 nm. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DS con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 2-vías con un post test de Tukey's para multicomparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

La adherencia de leucocitos inducida por QS-21 y MPLA se correlacionó con la expresión de moléculas de adhesión inducida por QS-21 y MPLA. Se observó en el ensayo de adhesión en el cual se utilizó un co-cultivo de leucocitos cargados con calceína agregadas a HUVEC en monocapa después 24 horas al estímulo con las condiciones. Los resultados del análisis muestran que hubo un aumento significativo en la adhesión de PBMC después de la estimulación con los adyuvantes en comparación a los controles (Figura 9), alcanzando valores similares en comparación con los observados en los controles positivos. Por otro lado, al combinar los adyuvantes con las concentraciones más bajas de ambos adyuvantes podemos observar que existe una atenuación en el reclutamiento de leucocitos que es estadísticamente significativa, como se muestra en la figura 10.

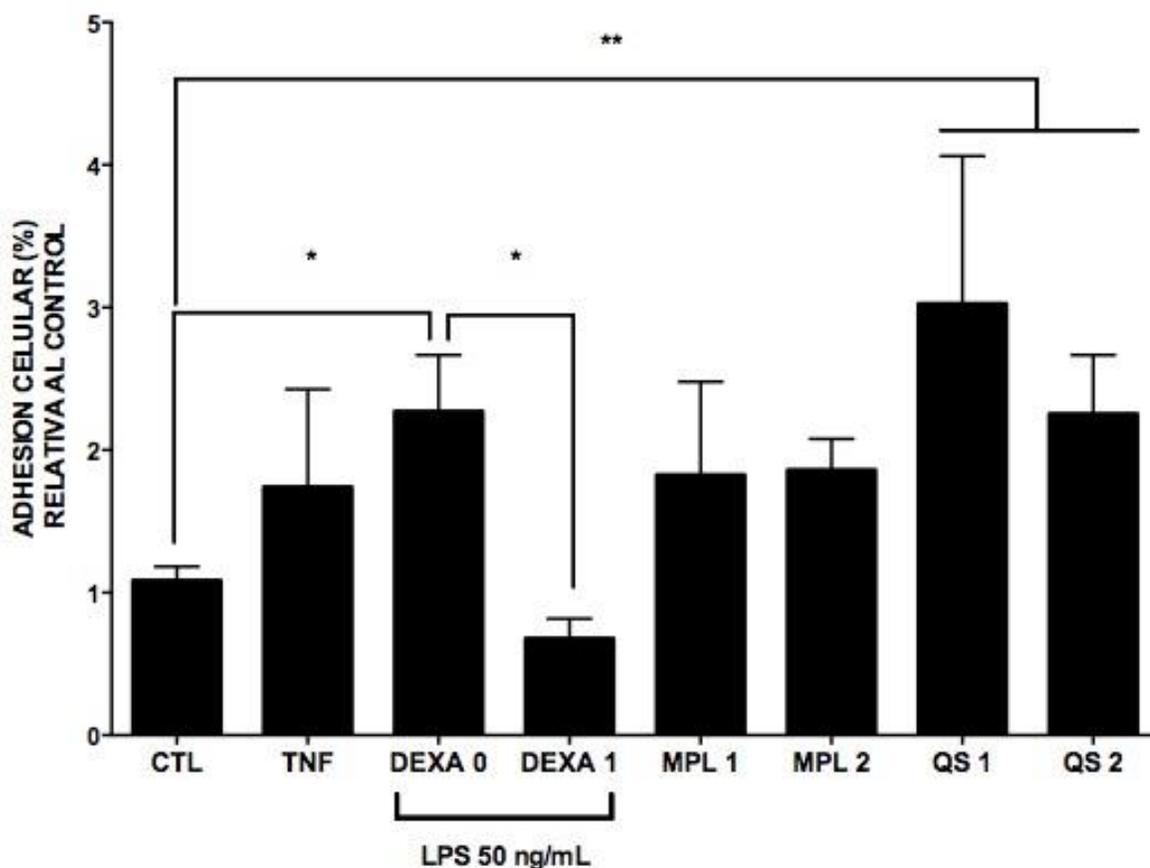


FIGURA 9. Evaluación de la adhesión celular 24 horas. Células HUVEC y PBMC en co-cultivo fueron incubadas con MPLA y QS-21 a 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas. Luego la fluorescencia

asociada a la adhesión de leucocitos a endotelio fue determinada a 490 nm. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DE con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 1-vías con un post test de Tukey's para multicomparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

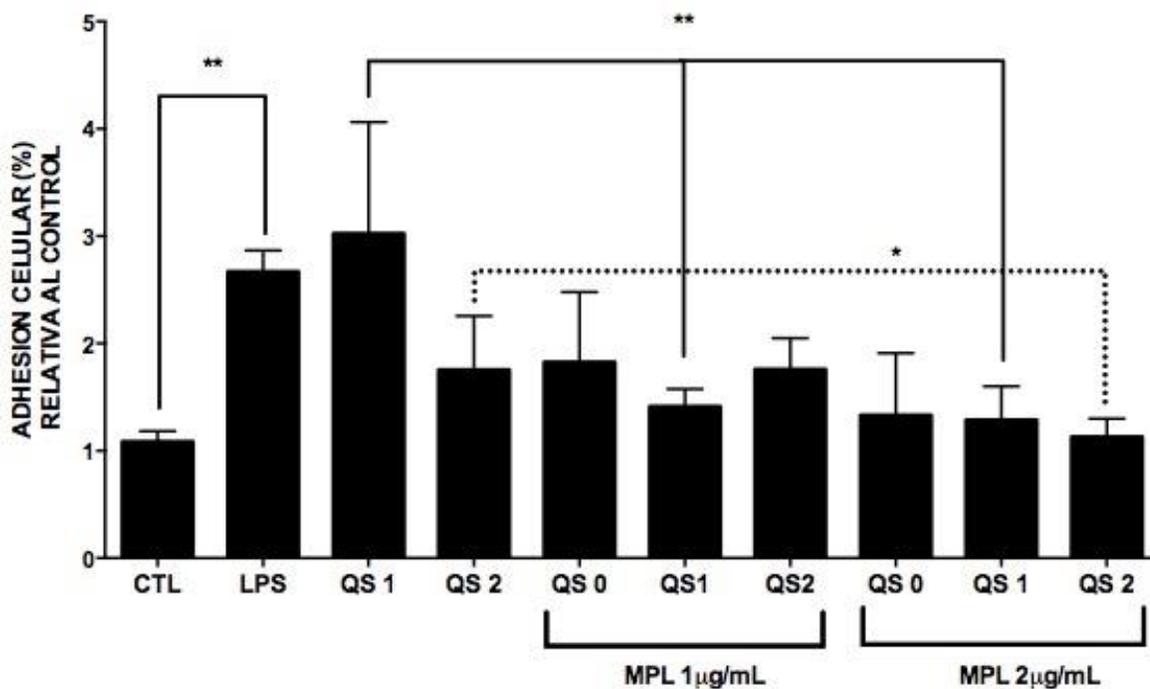
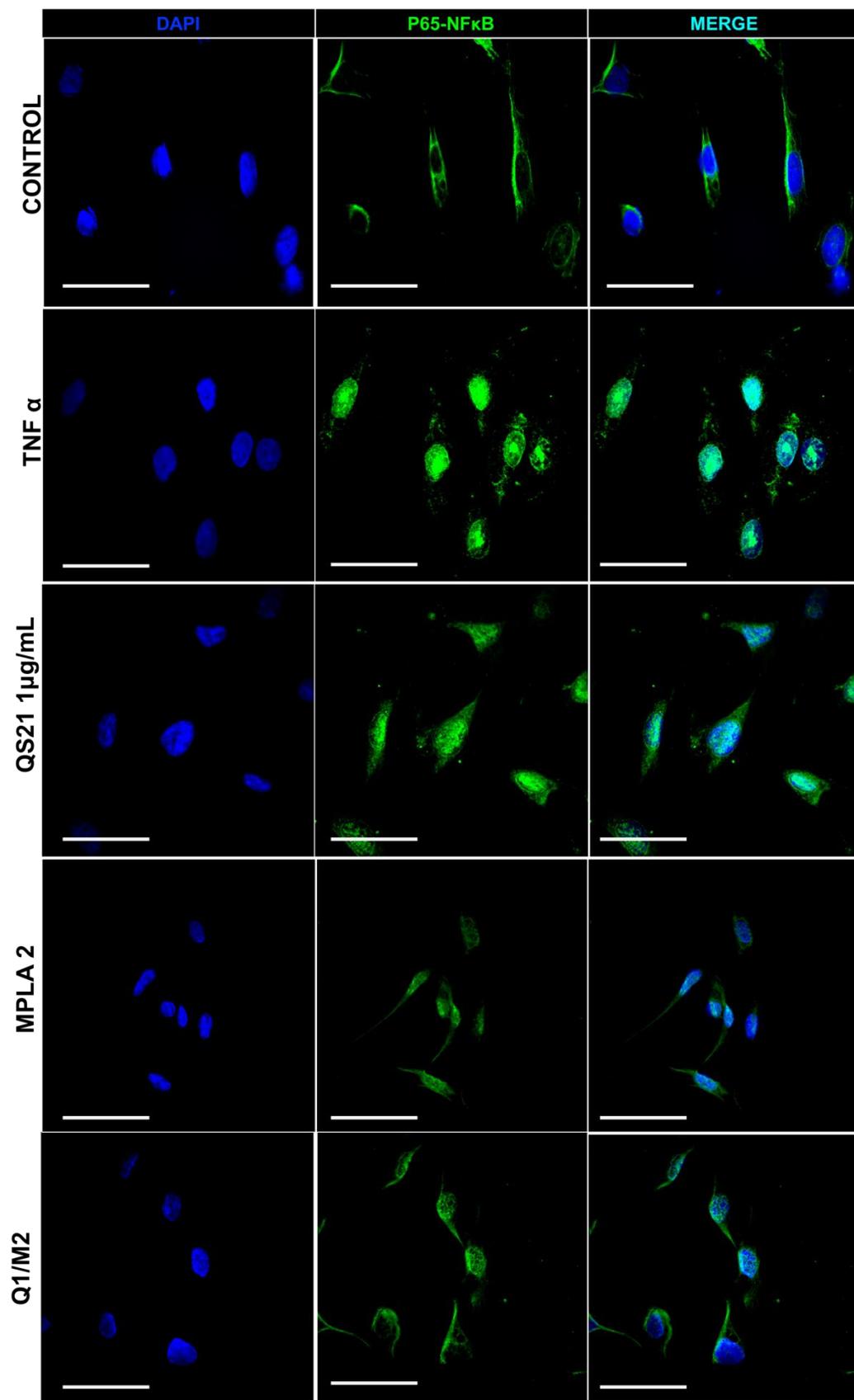


FIGURA 10. Evaluación de la adhesión celular 24 horas. Células HUVEC y PBMC en co-cultivo fueron incubadas con QS-21 a 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia de MPLA a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas. Luego la fluorescencia asociada a la adhesión de leucocitos a endotelio fue determinada a 490 nm. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DS con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 1-vías con un post test de Tukey's para multicomparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

Para evaluar si la acción de los adyuvantes involucra el mecanismo inflamatorio a través de la activación del factor de transcripción de NF κ B se determinó el grado de localización celular de p65, relacionando su presencia a nivel citoplasmático y a nivel nuclear, los resultados indican que la localización de p65 en el núcleo aumenta significativamente en presencia de QS-21 e interesantemente, la localización celular cambia en presencia de

MPLA generando un comportamiento más similar al control como se muestra en la figura 11. Sin embargo, si la combinación de ambos adyuvantes puede disminuir la citotoxicidad y la activación de la respuesta inflamatoria nos preguntamos si la inmunogenicidad también podría disminuir perdiendo el objetivo terapéutico de un adyuvante.



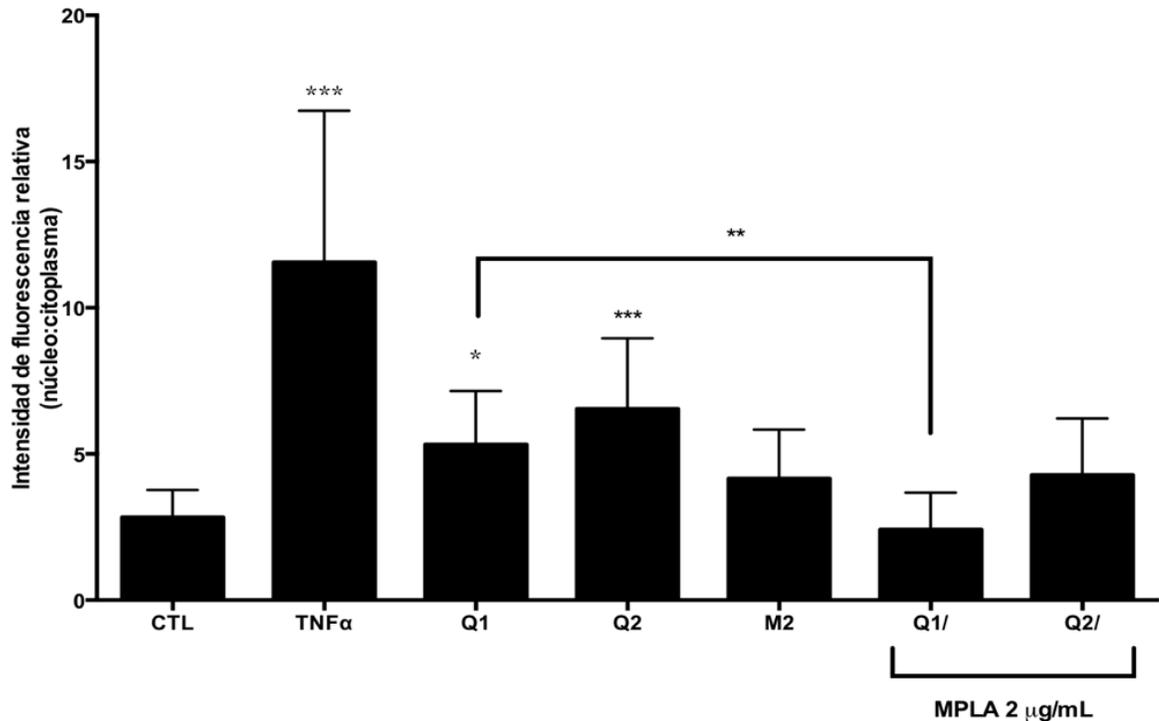


Figura 11. Evaluación de la activación y localización de NF κ B. Células HUVEC y PBMC en co-cultivo fueron incubadas con QS-21 a 1 y 2 μ g/mL en presencia de MPLA a 1 μ g/mL durante 3 horas. Luego la fluorescencia asociada al anticuerpo anti-human p65 fue determinada por microscopia confocal. A) Se observan las fotografías de microscopia confocal en corte-z ecuatorial con una magnificación de 100x. La barra representa 50 μ m. B) Se muestra la cuantificación de la fluorescencia relativa al área y a la localización núcleo: citoplasma. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DE con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 1-vías con un post test de Tukey's para multicomparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

Por último, para evaluar la respuesta inmunogénica se determinó la liberación de citoquinas en el sobrenadante del cultivo celular comparando la expresión de citoquinas proinflamatorias y regulatorias con el control y con el adyuvante AL(OH) $_3$ como referencia y se observó que QS-21 tiene un perfil Th2 estadísticamente aumentado en comparación con MPLA. Sin embargo, la combinación de QS-21 a 1 μ g/mL en presencia de MPLA 2 μ g/mL mantiene un perfil inmunogénico de tipo Th2 como se muestra en la figura 12.

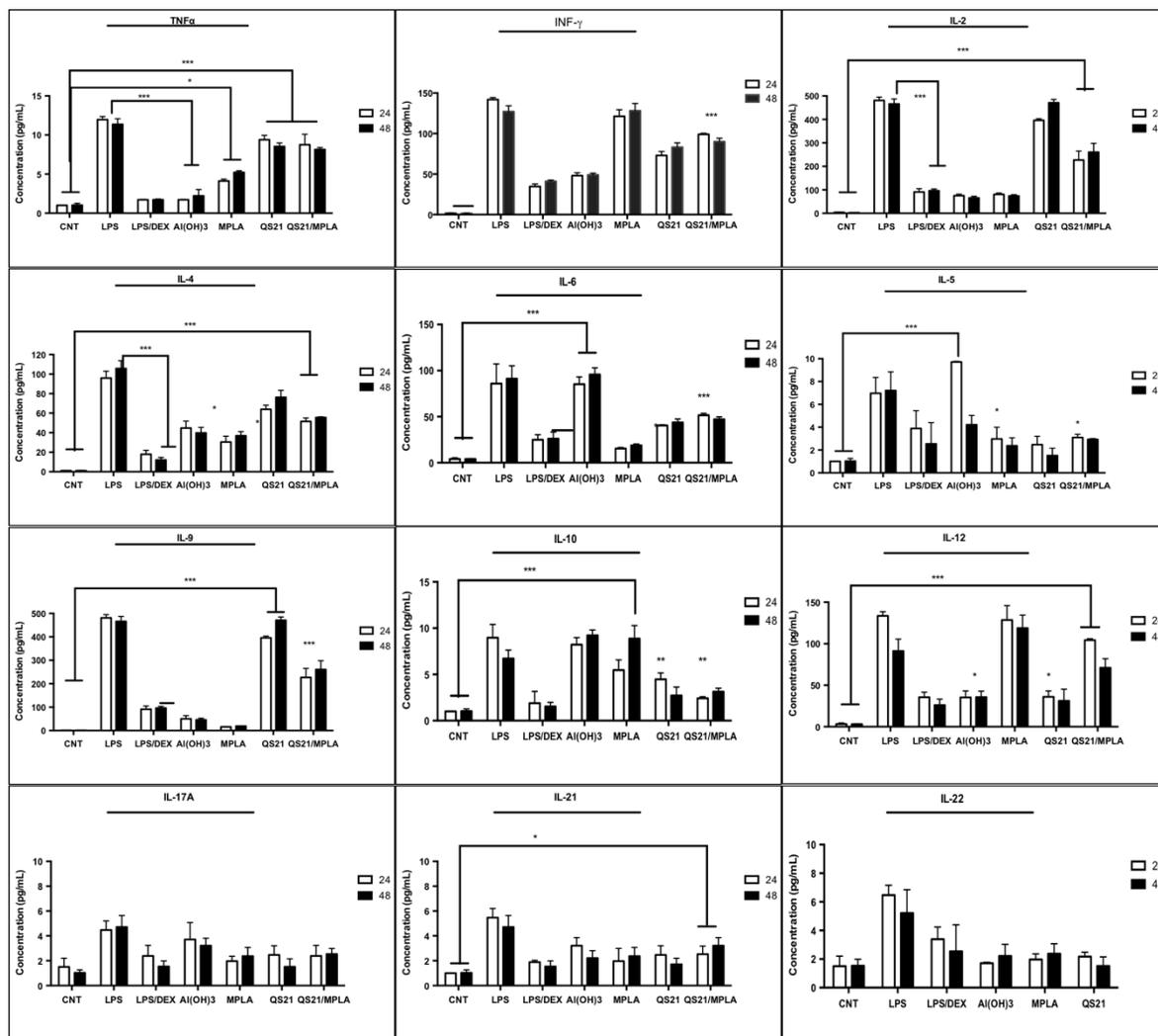


FIGURA. 12. Liberación de citoquinas proinflamatorias. Células HUVEC y PBMC fueron tratadas con los adyuvantes hidróxido de aluminio (AI(OH)₃) como control de referencia y QS-21 en presencia de MPLA 24 horas. Luego los sobrenadantes fueron recolectados y analizados por el ensayo Bead-Based por citometría de flujo. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

En nuestro modelo experimental, las concentraciones de adyuvantes usadas fueron extrapoladas a partir de las dosis de inmunizaciones probadas en estudios clínicos y preclínicos como también de las concentraciones en cultivos celulares. Las dosis usadas en los sistemas de adyuvantes que combinan QS-21 con MPLA como AS01 y AS02 van en el rango de 25 a 50ug (Coccia et al. 2017; Mikloska et al. 2000; Marty-Roix et al. 2016; Guo et al. 2017b). En otras publicaciones en las cuales se trabaja con cultivo celular, se utilizan dosis que van desde los 0,5 a 20 µg/mL de forma individual y mezclas en diferentes formas de administración de QS-21, como los liposomas denominados complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (Marty-Roix et al. 2016; Guo et al. 2017a; Mikloska et al. 2000). La conversión de la dosis de una vacuna a una unidad de concentración es muy similar a las usadas en ensayos *in vitro*, lo cual nos lleva a pensar que estos modelos debiesen ser más complejos por el hecho que las inmunizaciones ocurren principalmente en áreas intramusculares en las cuales interactúan muchos tejidos y de alguna forma se reducen las posibles toxicidades que puedan tener estas sustancias en el cuerpo humano.

Además, de acuerdo con los resultados presentados aquí, tanto QS21 y MPLA aumentaron la adhesión y de PBMC a HUVEC. Aunque este aumento funcional en la adhesión celular es más evidente con QS21, el resultado más sorprendente es la acción en combinación con MPLA. De hecho, el efecto antiinflamatorio del MPLA ya se había informado en (Stark et al. 2015). Este efecto se correlaciono con el efecto en la traslocación de NFkB. por lo que se puede especular que uno de los mecanismos por el cual MPLA genera esta disminución en la inmunogenicidad de QS21 es a través de la modulación de una vía que involucre NFkB ya que el mecanismo de MPLA seria dependiente de MyD88.

La capacidad de MPLA para disminuir el efecto en la adhesión y traslocación de NFkB en combinación de QS-21 no se relacionó el efecto en la secreción de citoquinas, en donde se identifica un perfil dual Thelper por un aumento estadísticamente significativo de IFNγ, IL-12 y IL-4. En otros trabajos como (Mikloska et al. 2000) las concentraciones de IL12 y INFy son similares a las mostradas en este trabajo, pero generadas por una combinación de MPLA/QS21 a 5 ug/ml. En (Luan et al. 2017) se muestra que MPLA tiene la capacidad

de inducir una respuesta Th1 predominantemente. Se podría especular que QS21 sería el que generaría la respuesta TH2 similar a la respuesta que genera los adyuvantes a base de sales de aluminio.

Con respecto a los efectos individuales de ambos adyuvantes en cuanto a inflamación, QS-21 se ha asociado principalmente a procesos de citotoxicidad, que tendrían como principal mecanismo las interacciones entre la saponina y el colesterol de la membrana, que promoverían la formación de poros de la membrana o lisis celular a través de su componente acilo, porque las desaciliasas no muestran toxicidad (Oliveira-Freitas et al. 2006) y no así a un mecanismo más específico como lo muestra. En el caso de MPLA existen investigaciones en donde se expone que este tendría la capacidad de inhibir respuestas inflamatorias cuando se expone células endoteliales a sustancias como LPS e hipotetiza que sería por un agonismo parcial débil a TLR4. Además, el efecto de MPLA dura hasta 16 h después de la exposición e induce la regulación negativa de MAPKs y ARNm de citocinas específicas de p38 (Stark et al. 2015). En otro trabajo se ha demostrado que MPLA mediante la vía de señalización TLR4-MyD88 atenúa la muerte celular y la liberación de citoquinas inflamatorias desencadenadas por la radiación (Guo et al. 2017).

Es un consenso mundial que los adyuvantes deben entregar un balance perfecto entre potencia farmacológica y toxicidad para generar una activación máxima del sistema inmune sin efectos adversos. Sin embargo, este equilibrio no se logra porque el mecanismo de estos se logra a través de una respuesta inmune que si persiste puede originar síndromes inflamatorios importantes.

Los modelos más ampliamente utilizados para la evaluación preclínica y los estudios mecanísticos de los adyuvantes son la activación de células presentadoras de antígeno *in vitro* y la inmunidad en modelos de roedores experimentales. Como se indicó anteriormente, puede haber discordancias sustanciales en las respuestas inmunológicas de ratones y humanos a los adyuvantes, como por ejemplo con el caso de los receptores TLR. Otras diferencias son las condiciones experimentales utilizadas, que a menudo no reflejan la práctica de la vacunación humana como las dosis que se utilizan en ratones, que frecuentemente son más altas que las que se usarían para una vacuna recombinante típica en humanos o las áreas de administración, que en el caso de ratones suelen ser

inyecciones intraperitoneal o intravenosa en lugar de las rutas subcutánea o intramuscular usadas en la aplicación clínica. Las diferentes rutas pueden conducir a la presentación diferencial de antígenos por subconjuntos específicos de DC. Aunque los ratones humanizados se pueden usar para evaluar la efectividad de los adyuvantes en la inmunidad innata, tales ratones pueden estar limitados en la actualidad para evaluar las respuestas de adaptación durante un período prolongado de tiempo (Shultz, Ishikawa, and Greiner 2007). La alternativa *in vivo* restante es usar NHP ya antes nombrados, debido a que son más similares a los humanos que los ratones con respecto a los subconjuntos de DC y la expresión de PRR. El principal problema para usar NHP es la disponibilidad de animales y el alto costo de mantenerlos, lo que a menudo limita el tamaño de los grupos de animales.

Por otro lado, los estudios con células sanguíneas *in vitro* tienen limitaciones en la evaluación de adyuvantes. Un modelo de co-cultivo como el utilizado en este trabajo de investigación intenta mostrar las posibles interacciones que podrían tener las células inmunes con un segundo tejido como es el endotelial, de importante responsabilidad en el proceso de reclutamiento leucocitario. En nuestro caso se utilizó PBMC humanas, pero muchas publicaciones se suele utilizar líneas inmortalizadas y de otro animal, lo cual le entrega menor sensibilidad al modelo. De igual forma este modelo sigue siendo deficiente porque no logra generar las respuestas que se generan a partir del total mecanismo inflamatorio que ocurre en el sitio de inyección ya que muchas veces estos adyuvantes buscan alterar la distribución anatómica del antígeno o permanecer en el sitio de inyección.

En el caso de vacunas animales, la mezcla heterogénea de carácter saponinico como es Quil-A de donde proviene QS-21 es ampliamente utilizada para aplicaciones veterinarias (Cunha et al. 2012; Ren et al. 2014), no así en humanos debido a su alta toxicidad (Sun, Xie, and Ye 2009). Se ha demostrado que la adición de Quil-A para vacunas contra la fiebre aftosa y la reproducción porcina y síndrome respiratorio (PRRS) había mejorado su inmunogenicidad en comparación con grupos de vacunas que no recibieron auxiliar. De similar forma QS-21 se usa como adyuvante en una vacuna comercialmente disponible para la leucemia felina (Marciani et al. 1991). Esto es un claro ejemplo de que con

posibles mejoras QS-21 podría tener la capacidad en humanos para generar una inmunización óptima contra patologías complejas en los tiempos actuales.

Un factor que no es considerado en los estudios con respecto a adyuvantes y vacunas, es el comportamiento inmunológico relacionado con la edad. Los grupos de edad infantil (2 a 6 meses) reciben la mayoría de las vacunas a través de los programas de vacunación de la mayoría de los países desarrollados, incluidos EE. UU. y la UE (Sanchez-Schmitz and Levy 2011). En particular, en los recién nacidos, en comparación con los adultos, la respuesta inmune a los TLRA (agonistas TLR) está polarizada con una menor producción de citoquinas Th1 y una robusta producción de citoquinas Th2 y antiinflamatorias. En el estudio (van Haren et al. 2016) se revela que existen diferencias significativas en la producción de citoquinas inducida por adyuvantes agonistas TLRA *in vitro*. En el caso de MPLA, este indujo concentraciones mayores de citocinas Th1, CXCL10, TNF e Interleucina (IL) -12p70 en sangre de bebés y adultos en comparación con la sangre de recién nacidos. Por lo tanto, es de importancia considerar el momento etario en la obtención de células inmunes a utilizar del grupo etario al cual vaya dirigida la vacuna o adyuvante a estudiar.

6. CONCLUSIÓN

Este trabajo nos permite concluir que el adyuvante QS-21 es citotóxico a concentraciones sobre 5 µg/mL. Sin embargo, el modelo de co-cultivo celular parece ser más resistente a este efecto en comparación a los modelos en monocultivo. Por otro lado, los adyuvantes muestran un efecto proinflamatorio aumentado que se ve atenuado en las combinaciones, demostrado por el aumento en el reclutamiento de leucocitos al endotelio y la consecuente activación del factor transcripcional NFκB. Interesantemente, en las combinaciones este efecto se ve disminuido sin perder la capacidad para generar la respuesta inmunogénica mediada por la liberación de citoquinas.

En proyección, es necesario evaluar la inmunogenicidad a través de la diferenciación de las subpoblaciones linfocitarias y la participación de otros mecanismos regulatorios como la activación de la señalización de Notch. Finalmente, estos datos muestran que complejizar el modelo celular, como por ejemplo a través de esferoides multicelulares podría demostrar una respuesta más relevante en relación con el efecto de los adyuvantes inmunológicos en la fisiología humana.

7. FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

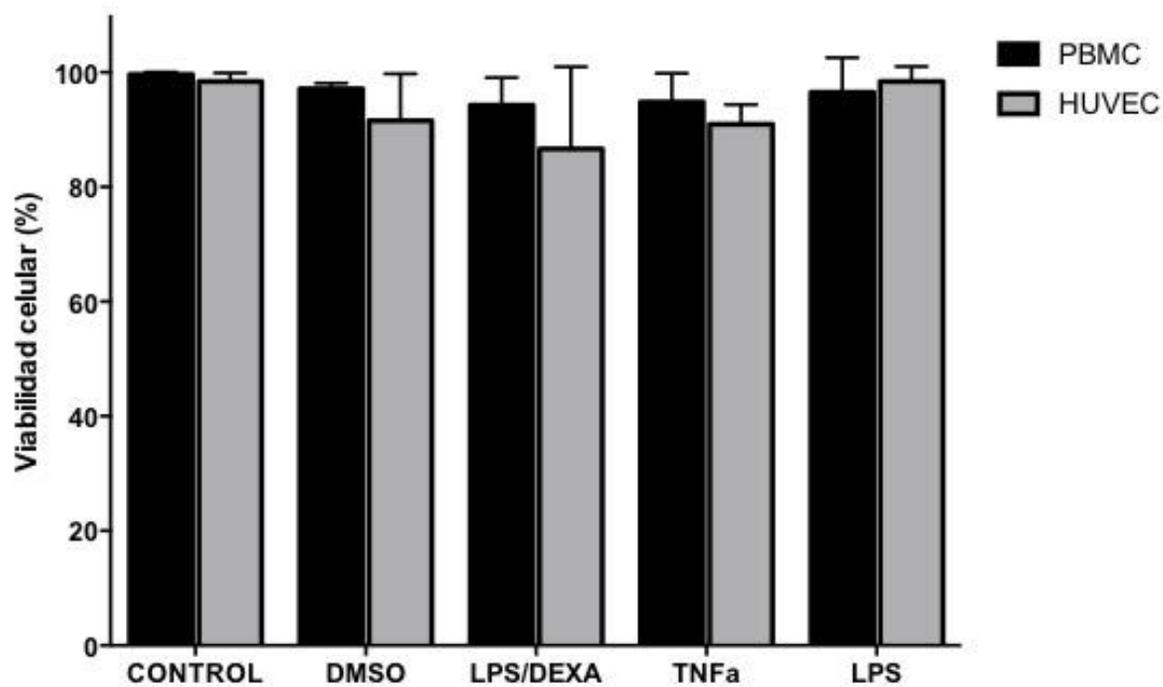


Figura Suplementaria 1. Evaluación de la citotoxicidad a 24 horas por el ensayo de MTT. Células HUVEC, PBMC y ambas en co-cultivo fueron incubadas a diferentes concentraciones de **A) QS-21** y **B) MPLA** durante 24 horas. Luego la formación de sales de formazan fue determinada a 540 nm. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DS con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 2-vías sin encontrar diferencias significativas.

Ordinary one-way ANOVA		A	B	C	D
Multiple comparisons		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	21			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	CTL vs. TNFa	-8.722	-11.03 to -6.412	Yes	****
8	CTL vs. Q1	-2.489	-4.824 to -0.1538	Yes	*
9	CTL vs. Q2	-3.708	-6.018 to -1.399	Yes	****
10	CTL vs. M2	-1.326	-3.688 to 1.037	No	ns
11	CTL vs. Q1/	0.4195	-1.973 to 2.812	No	ns
12	CTL vs. Q2/	-1.449	-3.842 to 0.9436	No	ns
13	TNFa vs. Q1	6.233	3.923 to 8.542	Yes	****
14	TNFa vs. Q2	5.013	2.730 to 7.297	Yes	****
15	TNFa vs. M2	7.396	5.058 to 9.733	Yes	****
16	TNFa vs. Q1/	9.141	6.773 to 11.51	Yes	****
17	TNFa vs. Q2/	7.273	4.905 to 9.640	Yes	****
18	Q1 vs. Q2	-1.220	-3.529 to 1.090	No	ns
19	Q1 vs. M2	1.163	-1.200 to 3.526	No	ns
20	Q1 vs. Q1/	2.908	0.5157 to 5.301	Yes	**
21	Q1 vs. Q2/	1.040	-1.353 to 3.432	No	ns
22	Q2 vs. M2	2.382	0.04503 to 4.720	Yes	*
23	Q2 vs. Q1/	4.128	1.760 to 6.496	Yes	****
24	Q2 vs. Q2/	2.259	-0.1085 to 4.627	No	ns
25	M2 vs. Q1/	1.745	-0.6742 to 4.165	No	ns
26	M2 vs. Q2/	-0.1232	-2.543 to 2.296	No	ns
27	Q1/ vs. Q2/	-1.869	-4.318 to 0.5804	No	ns
28					

FIGURA SUPLEMENTARIA 2. Análisis estadístico de la figura 5. Los datos fueron agrupados como promedio \pm DE con una distribución normal por D'Agostino & Pearson. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 1-vía con un post test de Tukey's para multicomparaciones. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adams, D. H., and S. Shaw. 1994. "Leucocyte-Endothelial Interactions and Regulation of Leucocyte Migration." *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92029-X).
- Alving, Carl R. 2002. "Design and Selection of Vaccine Adjuvants: Animal Models and Human Trials." *Vaccine* 20: S56–64. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00174-3).
- Baldrige, Jory R, Patrick McGowan, Jay T Evans, Christopher Cluff, Sally Mossman, David Johnson, and David Persing. 2004. "Taking a Toll on Human Disease: Toll-like Receptor 4 Agonists as Vaccine Adjuvants and Monotherapeutic Agents." *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 (7): 1129–38. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.7.1129>.
- Batista-duharte, Alexander, Erik B Lindblad, and Ernesto Oviedo-orta. 2011. "Progress in Understanding Adjuvant Immunotoxicity Mechanisms." *Toxicology Letters* 203 (2). Elsevier Ireland Ltd: 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.001>.
- Batista-Duharte, Alexander, Deivys Portuondo, O. Pérez, and Iracilda Zeppone Carlos. 2014. "Systemic Immunotoxicity Reactions Induced by Adjuvanted Vaccines." *International Immunopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.033>.
- Bonilla, Francisco A., and Hans C. Oettgen. 2010. "Adaptive Immunity." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>.
- Bonizzi, Giuseppina, and Michael Karin. 2004. "The Two NF-KB Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity." *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>.
- Che, Wenyi, Nicole Lerner-Marmarosh, Qunhua Huang, Masaki Osawa, Shinsuke Ohta, Masanori Yoshizumi, Michael Glassman, et al. 2002. "Insulin-like Growth Factor-1 Enhances Inflammatory Responses in Endothelial Cells: Role of Gab1 and MEKK3 in TNF-Alpha-Induced c-Jun and NF-KappaB Activation and Adhesion Molecule Expression." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000021127.83364.7D>.
- Cleland, Jeffrey L., Charlotte R. Kensil, Amy Lim, Neil E. Jacobsen, Louise Basa, Michael Spellman, Deborah A. Wheeler, Jia Yan Wu, and Michael F. Powell. 1996. "Isomerization and Formulation Stability of the Vaccine Adjuvant QS-21." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (1): 22–28. <https://doi.org/10.1021/js9503136>.
- Coccia, Margherita, Catherine Collignon, Caroline Hervé, Aurélie Chalon, Iain Welsby, Sophie Detienne, Mary J. Van Helden, et al. 2017. "Cellular and Molecular Synergy in AS01-Adjuvanted Vaccines Results in an Early IFN γ Response Promoting Vaccine Immunogenicity." *Npj Vaccines*. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0027-3>.
- Coffman, Robert L., Alan Sher, and Robert A. Seder. 2010. "Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work." *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
- Cunha, Ivo Alexandre Leme da, Dauton Luiz Zulpo, Alexey Leon Gomel Bogado, Luiz Daniel de Barros, Alessandra Taroda, Michelle Igarashi, Itamar Teodorico Navarro, and João Luis Garcia. 2012. "Humoral and Cellular Immune Responses in Pigs Immunized Intranasally with Crude Rhostry Proteins of Toxoplasma Gondii plus Quil-A." *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.034>.
- Fox, Christopher B., Martin Friede, Steven G. Reed, and Gregory C. Ireton. 2010. "Synthetic and Natural TLR4 Agonists as Safe and Effective Vaccine Adjuvants." *Sub-*

- Cellular Biochemistry* 53: 303–21. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_14.
- Garçon, Nathalie, and Marcelle Van Mechelen. 2011. “Recent Clinical Experience with Vaccines Using MPL- and QS-21-Containing Adjuvant Systems.” *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/erv.11.29>.
- Ghosh, Gregory Van Duyne, Sankar Ghosh, and Paul B. Sigler. 1995. “Structure of NF-KB P50 Homodimer Bound to AkB Site.” *Nature*. <https://doi.org/065/0>.
- Ghosh, Sankar, and Michael Karin. 2002. “Missing Pieces in the NF-KB Puzzle.” *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1).
- Goetz, Karen B, Michael Pfeleiderer, and Christian K Schneider. 2010. “First-in-Human Clinical Trials with Vaccines[What Regulators Want.” *Nat Biotech* 28 (9). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 910–16. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0910-910>.
- Guo, Jiaming, Yuanyuan Chen, Xiao Lei, Yang Xu, Zhe Liu, Jianming Cai, Fu Gao, and Yanyong Yang. 2017. “Monophosphoryl Lipid a Attenuates Radiation Injury through TLR4 Activation.” *Oncotarget* 8 (49). Impact Journals LLC: 86031–42. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20907>.
- Hajjar, Adeline M., Jeff H. Tsai, Christopher B. Wilson, and Samuel I. Miller. 2002. “Human Toll-like Receptor 4 Recognizes Host-Specific LPS Modifications.” *Nature Immunology* 3 (4): 354–59. <https://doi.org/10.1038/ni777>.
- Haren, Simon D. van, Lakshmi Ganapathi, Ilana Bergelson, David J. Dowling, Michaela Banks, Ronald C. Samuels, Steven G. Reed, Jason D. Marshall, and Ofer Levy. 2016. “In Vitro Cytokine Induction by TLR-Activating Vaccine Adjuvants in Human Blood Varies by Age and Adjuvant.” *Cytokine*. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.04.001>.
- Hemmi, Hiroaki, Tsuneyasu Kaisho, Osamu Takeuchi, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Katsuaki Hoshino, Takao Horiuchi, Hideyuki Tomizawa, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. 2002. “Small-Antiviral Compounds Activate Immune Cells via the TLR7 MyD88-Dependent Signaling Pathway.” *Nature Immunology* 3 (2): 196–200. <https://doi.org/10.1038/ni758>.
- Jeannin, Pascale, Sébastien Jaillon, and Yves Delneste. 2008. “Pattern Recognition Receptors in the Immune Response against Dying Cells.” *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.013>.
- Justus, Calvin R, Nancy Leffler, Maria Ruiz-Echevarria, and Li V Yang. 2014. “In Vitro Cell Migration and Invasion Assays.” *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 752: e51046. <https://doi.org/10.3791/51046>.
- Karin, Michael, and Yinon Ben-Neriah. 2000. “Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-KB Activity.” *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621>.
- Kato, Hiroki, Osamu Takeuchi, Shintaro Sato, Mitsutoshi Yoneyama, Masahiro Yamamoto, Kosuke Matsui, Satoshi Uematsu, et al. 2006. “Differential Roles of MDA5 and RIG-I Helicases in the Recognition of RNA Viruses.” *Nature* 441 (7089). England: 101–5. <https://doi.org/10.1038/nature04734>.
- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2009. “The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in Pathogen Recognition.” *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>.
- Kensil, C R, U Patel, M Lennick, and D Marciani. 1991. “Separation and Characterization of Saponins with Adjuvant Activity from Quillaja Saponaria Molina Cortex.” *The*

- Journal of Immunology* 146 (2): 431 LP-437.
<http://www.jimmunol.org/content/146/2/431.abstract>.
- Kim, Minsoo, Christopher V. Carman, Wei Yang, Azucena Salas, and Timothy A. Springer. 2004. "The Primacy of Affinity over Clustering in Regulation of Adhesiveness of the Integrin AL β 2." *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404160>.
- Klinman, Dennis M., Debra Currie, Ihsan Gursel, and Daniela Verthelyi. 2004. "Use of CpG Oligodeoxynucleotides as Immune Adjuvants." *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00148.x>.
- Luan, Liming, Naeem K. Patil, Yin Guo, Antonio Hernandez, Julia K. Bohannon, Benjamin A. Fensterheim, Jingbin Wang, et al. 2017. "Comparative Transcriptome Profiles of Human Blood in Response to the Toll-like Receptor 4 Ligands Lipopolysaccharide and Monophosphoryl Lipid A." *Scientific Reports* 7 (November 2016): 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep40050>.
- Ma, Yifan, Louis Poisson, Guzman Sanchez-Schmitz, Santosh Pawar, Chunfeng Qu, Gwendalyn J. Randolph, William L. Warren, Eric M. Mishkin, and Russell G. Higbee. 2010. "Assessing the Immunopotency of Toll-like Receptor Agonists in an in Vitro Tissue-Engineered Immunological Model." *Immunology* 130 (3): 374–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03237.x>.
- Marciani, Dante J., Charlotte R. Kensil, Gerald A. Beltz, Chung ho Hung, Joelle Cronier, and Andre Aubert. 1991. "Genetically-Engineered Subunit Vaccine against Feline Leukaemia Virus: Protective Immune Response in Cats." *Vaccine*. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90262-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90262-5).
- Marty-Roix, Robyn, Gregory I. Vladimer, Kimberly Pouliot, Dan Weng, Rachel Buglione-Corbett, Kim West, John D. MacMicking, et al. 2016. "Identification of QS-21 as an Inflammasome-Activating Molecular Component of Saponin Adjuvants." *Journal of Biological Chemistry* 291 (3): 1123–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683011>.
- Mikloska, Z, M Rückholdt, I Ghadiminejad, H Dunckley, M Denis, and A L Cunningham. 2000. "Monophosphoryl Lipid A and QS21 Increase CD8 T Lymphocyte Cytotoxicity to Herpes Simplex Virus-2 Infected Cell Proteins 4 and 27 through IFN-Gamma and IL-12 Production." *Journal of Immunology*. https://doi.org/ji_v164n10p5167 [pii].
- Moser, Muriel, and Oberdan Leo. 2010. "Key Concepts in Immunology." *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>.
- Newman, M. J., J. Y. Wu, B. H. Gardner, C. A. Anderson, C. R. Kensil, J. Recchia, R. T. Coughlin, and M. F. Powell. 1997. "Induction of Cross-Reactive Cytotoxic T-Lymphocyte Responses Specific for HIV-1 Gp120 Using Saponin Adjuvant (QS-21) Supplemented Subunit Vaccine Formulations." *Vaccine* 15 (9): 1001–7. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00293-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00293-9).
- Oeckinghaus, Andrea, and Sankar Ghosh. 2009. "The NF-KappaB Family of Transcription Factors and Its Regulation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>.
- Oliveira-Freitas, E., C. P. Casas, G. P. Borja-Cabrera, F. N. Santos, D. Nico, L. O P Souza, L. W. Tinoco, et al. 2006. "Acylated and Deacylated Saponins of Quillaja Saponaria Mixture as Adjuvants for the FML-Vaccine against Visceral Leishmaniasis." *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.034>.
- Ragupathi, Govind, Jeffrey R. Gardner, Philip O. Livingston, and David Y. Gin. 2011. "Natural and Synthetic Saponin Adjuvant QS-21 for Vaccines against Cancer." *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/erv.11.18>.

- Reed, Steven G, Mark T Orr, and Christopher B Fox. 2013. "Key Roles of Adjuvants in Modern Vaccines." *Nature Medicine* 19 (12). United States: 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>.
- Rehli, Michael. 2002. "Of Mice and Men: Species Variations of Toll-like Receptor Expression." *Trends in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02259-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02259-7).
- Ren, Jingqiang, Huijun Lu, Shubo Wen, Wenchao Sun, Fulong Yan, Xing Chen, Jie Jing, et al. 2014. "Enhanced Immune Responses in Pigs by DNA Vaccine Coexpressing GP3 and GP5 of European Type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Journal of Virological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.05.021>.
- San Martin, Ricardo, and Reinaldo Briones. 1999. "Industrial Uses and Sustainable Supply of Quillaja Saponaria (Rosaceae) Saponins." *Economic Botany* 53 (3): 302–11. <https://doi.org/10.1007/BF02866642>.
- Sanchez-Schmitz, Guzman, and Ofer Levy. 2011. "Development of Newborn and Infant Vaccines." *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001880>.
- Senfleben, U. 2001. "Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF-Kappa B Signaling Pathway." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>.
- Shultz, Leonard D, Fumihiko Ishikawa, and Dale L Greiner. 2007. "Humanized Mice in Translational Biomedical Research." *Nature Reviews. Immunology* 7 (2): 118–30. <https://doi.org/10.1038/nri2017>.
- Stark, Ryan, Hyehun Choi, Stephen Koch, Fred Lamb, and Edward Sherwood. 2015. "Monophosphoryl Lipid A Inhibits the Cytokine Response of Endothelial Cells Challenged with LPS." *Innate Immunity* 21 (6): 565–74. <https://doi.org/10.1177/1753425914564172>.
- Steeghs, Liana, A. Marijke Keestra, Andries Van Mourik, Heli Uronen-Hansson, Peter Van Der Ley, Robin Callard, Nigel Klein, and Jos P M Van Putten. 2008. "Differential Activation of Human and Mouse Toll-like Receptor 4 by the Adjuvant Candidate LpxL1 of Neisseria Meningitidis." *Infection and Immunity* 76 (8): 3801–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.00005-08>.
- Sun, Hong Xiang, Yong Xie, and Yi Ping Ye. 2009. "Advances in Saponin-Based Adjuvants." *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>.
- Vasou, Andri, Nazife Sultanoglu, Stephen Goodbourn, Richard E Randall, and Leondios G Kostrikis. 2017. "Targeting Pattern Recognition Receptors (PRR) for Vaccine Adjuvantation: From Synthetic PRR Agonists to the Potential of Defective Interfering Particles of Viruses." *Viruses* 9 (7). Switzerland. <https://doi.org/10.3390/v9070186>.
- World Health Organization. 2013. "Guidelines on the Nonclinical Evaluation of Vaccine Adjuvants and Adjuvanted Vaccines." *WHO Press*, no. October: 56. http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf?ua=1.
- Zandi, Ebrahim, David M. Rothwarf, Mireille Delhase, Makio Hayakawa, and Michael Karin. 1997. "The I κ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK α and IKK β , Necessary for I κ B Phosphorylation and NF-KB Activation." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80406-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80406-7).