

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación citotóxica de Adyuvantes Finlay en células de fibroblasto de embrión de pollo y de salmón

Caridad Zayas^{1*}, Iván Tobar², Jaime Tobar², Miriam Lastre¹, Daniel Arencibia¹, Luis Velásquez³ y Oliver Pérez¹.

Instituciones:

¹Instituto Finlay. La Habana, Cuba.

²CENTROVET, Compañía de Ciencia en salud animal, Chile.

³Universidad de Santiago de Chile, Chile.

*E-mail: czayas@finlay.edu.cu

Resumen

Los estudios de evaluación de la citotoxicidad de fármacos pueden ser realizados *in vitro* en diferentes líneas celulares. La inocuidad es imprescindible evaluarla en los adyuvantes inmunológicos, pues la toxicidad esta asociada a los mismos. Ensayos en pruebas de citotoxicidad tan sencillas como el de viabilidad pueden ser empleados para determinar la toxicidad de dichos adyuvantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los adyuvantes AFCo1 (Adyuvante Finlay Cocleato 1) y AFPL1 (Adyuvante Finlay (AF) proteoliposoma 1) al ser enfrentados a diferentes líneas celulares mediante la técnica de Exclusión del colorante azul tripan. El efecto tóxico del AFCo1 y el AFPL1 sobre las líneas celulares CHSE-214 de salmón y UMN SAH/DF-1 de fibroblastos de embrión de pollo fue determinado. El estudio demostró que los adyuvantes AFCo1 y AFPL1 poseen baja citotoxicidad tanto para la línea celular CHSE-214 como para UMN SAH/DF-1.

Palabras clave: Adyuvantes, AFPL1, AFCo1, citotoxicidad, *in vitro*, líneas celulares.

Abstract

Cytotoxic assessment of Finlay Adjuvant in cells of chicken embryo fibroblast and salmon.

Evaluation studies of the cytotoxicity of drugs can be performed *in vitro* in different cell lines. Safety is essential to evaluate the immunological adjuvants, because the toxicity is associated with them. Essays in cytotoxicity tests as simple as the feasibility can be used to determine the toxicity of these adjuvants. The aim of this study was to evaluate *in vitro* cytotoxicity AFCo1 adjuvant (Adjuvant Finlay Cocleato 1) and AFPL1 (Adjuvant Finlay (AF) proteoliposome 1) to be faced with different cell lines using the technique of trypan blue dye exclusion. The toxic effect of AFCo1 and AFPL1 on CHSE-214 cell lines and UMN salmon embryo fibroblasts SAH/DF-1 chicken was determined. The study showed that adjuvants AFPL1 AFCo1 and have low cytotoxicity both the CHSE-214 cell line to SAH/DF-1 UMN.

Key words: Adjuvants, AFPL1, AFCo1, cytotoxicity, *in vitro*, cellular lines.

Introducción

El desarrollo de una vacuna exitosa requiere del conocimiento de los adyuvantes a usar y saber cómo formular los adyuvantes con los antígenos para lograr estables y seguras vacunas inmunogénicas. Para la mayoría de los investigadores de vacunas esta información no está fácilmente disponible, ni el acceso a adyuvantes bien caracterizados (1). Hoy, con pocas excepciones, las vacunas licenciadas para ser usadas en humanos son administradas por vía parenteral y resultan apropiadas para la prevención de enfermedades sistémicas por agentes invasivos; pero no son capaces de inducir respuesta inmune a nivel de las mucosas (2, 3, 4). Las vacunas mucosales se han planteado como una estrategia prometedora para inducir protección mucosal, así como, inmunidad sistémica (6). Además de su bajo costo y la eliminación de jeringuillas y agujas, cuyo uso incrementa el riesgo de infecciones de transmisión de enfermedades como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y los virus de hepatitis B y C (7, 8). El mayor problema de estas vacunas es que no se cuenta prácticamente con adyuvantes seguros para su uso en humanos (8). La introducción de adyuvantes potentes en los ensayos clínicos, comenzó en relación con las vacunas preventivas y terapéuticas en las que los adyuvantes de aluminio han sido efectivos, pero desventajas como su toxicidad han hecho que uno de los objetivos del desarrollo actual en materia de los adyuvantes, consista en disminuir al máximo su toxicidad sin afectar el efecto inmunopotenciador (9).

Existen técnicas toxicológicas sencillas como los estudios de cultivos celulares que nos permiten entre otras ventajas, realizar pruebas rápidas y directas para evaluar la toxicidad de nuevos productos; disminuir los costos de los ensayos; permitir una mayor sensibilidad debido a su carácter citológico, entre otras. La toxicología celular puede considerarse como el conjunto de investigaciones cualitativas y cuantitativas, sobre los efectos nocivos o respuestas biológicas no deseadas, que experimenta un cultivo celular expuesto a un determinado compuesto químico, a fin de poder extrapolar los resultados a nivel de organismo. Este tipo de pruebas pueden también ser utilizadas como alternativa al uso de animales en ensayos toxicológicos. A pesar de que las pruebas *in*

vivo no podrán ser substituidas por completo, ésta es una rama de la ciencia que avanza, minimizando en la medida de lo posible la utilización de organismos en los bioensayos. Los numerosos estudios de este campo, han permitido que se pueda viabilizar el cultivo de una gran variedad de líneas celulares de diferentes órganos y especies, sobre los que realizar cualquier tipo de estudio de carácter biológico, bioquímico o molecular (10).

A lo largo de los años se han ido creando una gran variedad de pruebas y criterios para evaluar los efectos que presenta un cultivo después de su exposición a un determinado compuesto químico, entre ellas podemos mencionar: las pruebas citológicas; la observación al microscopio; las pruebas bioquímicas y las pruebas de viabilidad. También ha ido incrementándose el número de líneas celulares a usar en los ensayos de citotoxicidad, siendo las más usadas las líneas celulares de aves, de mamíferos y de peces (10).

En la busca de nuevos adyuvantes efectivos y seguros para su uso en humanos, nuestro Instituto se ha volcado al diseño de una plataforma de adyuvantes el AFPL1 (Adyuvante Finlay Proteoliposome 1) y AFCo (Cocleato) 1, derivados de *Neisseria meningitidis* serogrupo B para la administración parenteral y mucosal, respectivamente. El AFPL1 es una nanopartícula derivada de la membrana externa de *N. meningitidis* B. Este ha sido usado ampliamente como el antígeno principal de la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC™ (11,12). Más de 60 millones de dosis de esta vacuna ya han sido administradas en humanos. El AFPL1 contiene proteínas mayoritarias de la membrana externa y varios patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), entre los que se encuentran el lipopolisacárido (LPs); las porinas y trazas de DNA (ácido desoxirribonucleico) de *N. meningitidis* que son reconocidos por TLR-4, TLR-2 y TLR-9, respectivamente. El PL es consistentemente producido bajo condiciones GMP en el del Instituto Finlay, La Habana, Cuba. Adicionalmente, hemos transformado AFPL1 en el AFCo1. El AFCo1 es una estructura coclear derivada de la interacción de lípidos de aniónicos del PL con cationes bivalentes, como Ca²⁺. Los cationes establecen un puente iónico entre los dos cargos negativos de los lípidos de membranas adyacentes estabilizando al AFCo1, formando micropartículas que contienen

los mismos componentes principales de AFPL1 incluyendo a sus MAMPs (12). Teniendo en cuenta las potencialidades de estos adyuvantes nos propusimos conocer las concentraciones a las cuales pudieran resultar tóxicas al ser enfrentadas a diferentes líneas celulares.

El ensayo de citotoxicidad fue realizado en células de fibroblastos de embrión de pollo UMN SAH/DF-1 y en células de salmón CHSE-214. La concentración máxima tolerada por las células UMN SAH/DF1 fue de 15 µg/mL al ser expuesta al adyuvante AFPL1 y para AFCo1 fue de 5 µg/mL. Para las células CHSE-214 la concentración máxima tolerada fue de 15 µg/mL al ser enfrentada al adyuvante AFPL1 y 5 µg/mL para el AFCo1. De forma general tanto el AFPL1 como el AFCo1 fueron tolerados a concentraciones desde 5 µg/mL. 0,05 µg/mL. Los estudios de citotoxicidad realizados corroboran los resultados obtenidos en estudios toxicológicos previos (13,14), quedando demostrada la no toxicidad *in vitro* en los modelos (15) y dosis evaluadas de los adyuvantes AFCo1 y AFPL1.

Materiales y métodos

Sustancias evaluadas

-AFPL1, está compuesto por vesículas de membrana externa, también referidas como PL, extraídas de la membrana externa de *N. meningitidis* B con detergente Desoxicolato de Sodio (DOC). El PL ha sido ampliamente usado como antígeno principal de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOCC-BC™ (11,12). AFPL1 se utilizó a diferentes concentraciones (AFPL1-1= 150 µg/mL, AFPL1-2= 15 µg/mL, AFPL1-3= 1,5 µg/mL y AFPL1-4= 0,15 µg/mL).

-AFCo1 diálisis (AFCo1 d) derivado de los PL consiste en un complejo altamente estable de membranas lipídicas, proteínas y Calcio. Se forman cuando los PL son lentamente expuestos a una solución tampón de CaCl₂, a través de un proceso de diálisis (16,17). Se

utilizó a diferentes concentraciones (AFCo1d-1= 50 µg/mL, AFCo1d-2= 5 µg/mL, AFCo1d-3= 0,5 µg/mL y AFCo1d-4= 0,05 µg/mL).

-AFCo1 Filtración tangencial (AFCo1 FT), consiste en un complejo altamente estable de membranas lipídicas, proteínas y Calcio. Se forman cuando los PL son lentamente expuestos a una solución tampón de CaCl₂, a través de un proceso de filtración tangencial (17,18). Se utilizaron diferentes concentraciones (AFCo1FT-1= 36,5 µg/mL, AFCo1FT-2= 3,65 µg/mL, AFCo1 FT-3= 0,365 µg/mL] y AFCo1FT-4= 0,0365 µg/mL.

-AFCo1 Estéril (AFCo1 E) (Adyuvante Finlay Cocleato 1) obtenido mediante un nuevo proceso estéril (19). Para la obtención del AFCo1, los PL se resuspendieron en tampón de resuspensión que contenía: Trihidroxi metil aminometano (Tris) 30 mM (Fluka, Suiza) y desoxicolato de Na (DOC, Merck, Alemania) al 1,0 % como detergente. La concentración de proteínas de esta solución se ajustó a $2,3 \pm 0,2$ mg/mL. El PL una vez resuspendido, se incubó 20 min a 37°C y se sonicó la mezcla durante 10 min a 50 KHz en un equipo de sonicación de sonda (Labsonic U, BBraun, Alemania). Posteriormente, la solución se filtró por un filtro de 0,2 µm (Milipore). Se procede al proceso de obtención del AFCo1 adicionando al reservorio que contiene la solución de PL filtrada, un tampón de formación (TF) el cual contiene Cloruro de Calcio (CaCl₂, Merck, Alemania) a 10 mM, Cloruro Sodio (NaCl, Merck, Alemania), Tris. La adición del volumen de TF se realiza de manera lenta (8.3 mL por minutos) y se va agitando (se utiliza agitador magnético) hasta la aparición de un precipitado blanquecino característico que indica la formación de las estructuras cocleares y cristales de Ca⁺. La suspensión se deja en reposo durante 30 minutos y posteriormente se procede a la etapa de lavado con el objetivo de eliminar el DOC en exceso y los cristales de calcio. Para ello se adicionó el tampón de lavado (TL) que está constituido por Tris 10mM (3 veces el volumen del cocleato formado). Se deja unos minutos a que sedimente el precipitado blanquecino y se elimina el sobrenadante. Todo este proceso se realiza bajo condiciones estériles en un gabinete de seguridad, Para los estudios de citotoxicidad se utilizaron diferentes concentraciones (AFCo1 E-1= 50 µg/mL, AFCo1 E-2= 5 µg/mL, AFCo1 E-3= 0,5 µg/mL y AFCo1 E-4= 0,05 µg/mL).

-Células y controles. Se utilizaron células de embrión de pollo UMN SAH/DF-1 expuestas a medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Middlesex, Inglaterra) sin suplementar y células de salmón CHSE-214 expuesta a Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) (Gibco, Middlesex, Inglaterra) sin suplementar.

Además se utilizó como solución buffer TRIS-Ca²⁺ a las siguientes concentraciones:

CB1= Control tampón (Ca²⁺) 0,05mM CB2= Control tampón (Ca²⁺) 0,005mM, CB3= Control tampón (Ca²⁺) 0,0005mM y CB4= Control tampón (Ca²⁺) 0,00005mM.

Sustancias de referencia

El estudio se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad de respuesta inmediata o a corto plazo utilizando la técnica de exclusión del azul tripan (15,20-23). Se utilizó azul tripan como tinción colorimétrica para determinar la viabilidad celular.

Se utilizaron placas de cultivo 12 pocillos (COSTAR), Cámara de Neubauer para el conteo de las células, Microscopio invertido de contraste de fase (OPTON), pipetas Eppendorf, cámara fotográfica Kodak y botellas de cultivo T-150.

Procedimiento

Cultivo de líneas celulares

El cultivo de las líneas celulares CHSE-214 de salmón Chinook CHSE-214 y UMN SAH/DF-1 de fibroblasto de embrión pollo se realizó bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las células embrionarias de salmón Chinook CHSE-214, fueron cultivadas en monocapas al 80% de confluencia en un Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, Middlesex, Inglaterra) con bicarbonato de sodio (2,2 g/L, Merck, Darmstadt, Alemania) y suero fetal bovino (SBF, Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) entre 2-5% a 20 °C. Cada 10 días las células fueron subcultivadas usando 1 mL de tripsina con una concentración de 2,5 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y 1 mM de EDTA (Merck) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se controló el crecimiento de los cultivos mediante observación diaria al microscopio invertido de contraste de fase (24). El cultivo de la línea celular de fibroblasto de embrión pollo UMN SAH/DF-1 se realizó como fue previamente descrito por

C. Colmenares (25), excepto que se utilizó en este caso Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) con 10% SBF (26).

Células CHSE-214 de salmón y células de embrión de pollo UMN SAH/DF-1 confluentes, provenientes de dos botellas de cultivos T-150, se repartieron en placas de 12 pocillos (1mL por pocillo: aproximadamente 2×10^5 cel/mL). Se dejaron toda la noche para permitir que las células se adhirieran a la superficie, y en la mañana siguiente se les cambió el medio añadiendo las diferentes concentraciones de los adyuvantes a evaluar. Se dejó incubando con cada adyuvante por 24 horas a 18°C, realizándose 4 réplicas para cada tipo de diseño. Al día siguiente se observó el efecto citotóxico en microscopio invertido.

Viabilidad

Se resuspendieron las células en medio de cultivo y se evaluó su viabilidad mediante la técnica de exclusión del azul tripan, mediante el uso de cámara de Neubauer y colorante azul tripan, fue utilizado un microscopio óptico. La membrana plasmática de las células muertas es permeable a este colorante vital permitiendo, por lo tanto, diferenciar dichas células de las vivas simultáneamente al contaje celular.

Se calculó el porcentaje de Viabilidad Celular para los distintos adyuvantes a partir del número de células viables recuperadas en cada caso. Se tomó como referencia el valor obtenido para el control negativo en cada experimento, el cual se consideró el 100% de viabilidad. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Análisis estadístico

Se procedió a verificar los resultados para realizar el análisis de varianza, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por lo cual, todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación, establecido fue α 0.05. Todos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico

Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y discusión

Son numerosas las evaluaciones a llevar a cabo para poder registrar y validar un nuevo adyuvante, donde el componente inmunotológico tiene una gran importancia. La determinación del efecto tóxico a todos los niveles posibles, ha servido para disminuir el riesgo a efectos indeseables de las vacunas utilizadas en humanos y en los animales (27).

El empleo de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* nos permite incrementar el conocimiento sobre la toxicidad de los productos que se utilizarán en la formulación vacunal y de la vacuna *per se*. En la determinación de la toxicidad existe una necesidad imperiosa de utilizar ensayos relativamente simples y rápidos para estimar el riesgo de compuestos específicos y su papel en la toxicidad celular (10).

En este estudio se evaluó la toxicidad de dos potentes adyuvantes: el AFCo1 (obtenido por diferentes metodologías) y el AFPL1 derivados ambos de la membrana externa de *N. meningitidis* B. Las placas de cultivo incubadas con las células CHSE-214 y UMN SAH/DF-1 y los adyuvantes a diferentes concentraciones, fueron observadas a través de un microscopio invertido, divisándose el efecto citotóxico de los adyuvantes mediante la invariabilidad del color del medio de cultivo el cual debería mantenerse de color rosado. En la figura 1 se muestran las placas de 12 pocillos con las células de fibroblastos de embrión de pollo al ser enfrentadas a diferentes concentraciones del adyuvante AFCo1 (d). El cambio de color del medio de cultivo nos da noción de la tolerancia de las células ante diferentes concentraciones de los adyuvantes. A menores concentraciones de los adyuvantes menos propensa será la exposición de las células al cambio de coloración. Se puede observar (figura 1) un cambio de color rosado a un color amarillo, lo cual nos da la medida de la muerte celular, cuantificado esto mediante

conteo celular en cámara de Neubauer con el colorante azul tripan determinando la viabilidad celular.

Se dejó incubando con cada concentrado por 24 horas a 18°C. Al día siguiente se observó el efecto citotóxico en microscopio invertido (figura 2) y se procedió a cuantificar la viabilidad de las células mediante el uso de cámara Neubauer y azul tripan .

La confirmación de la viabilidad de las células enfrentadas a los adyuvantes se determinó mediante el empleo de la técnica de exclusión del azul tripan (como comentamos con anterioridad). El ensayo de citotoxicidad realizado en células de fibroblastos de embrión de pollo UMN SAH/DF-1 y en células de salmón CHSE-214, demostró que la concentración máxima tolerada por las células UMN SAH/DF1 fue de 15 µg/mL al ser expuesta al adyuvante AFPL1 y para AFCo1 fue de 10 veces menor de su concentración mayor. Para las células CHSE-214, la concentración máxima tolerada fue de 15 µg/mL al ser enfrentada al adyuvante AFPL1 y para el AFCo1, las mayores concentraciones del adyuvante fueron toleradas por estas células de salmón.

La figura 4 representa los valores medios del porcentaje de viabilidad celular obtenidos para los distintos controles y los diferentes adyuvantes en estudio utilizando la línea celular CHSE-24.

Como puede observarse en la figura 4 existen diferencias significativas (* $p \leq 0.05$) entre la viabilidad celular del control negativo y el tampón CB1, AFPL1-1 y AFCo1 d-1 a las máximas concentraciones de exposición ante las células de salmón. No se observaron diferencias significativas entre la viabilidad celular del control negativo y las máximas concentraciones del AFCo1 FT-1 y el AFCo1 E-1 tras su exposición a células de salmón.

La figura 5 representa los valores medios del porcentaje de viabilidad celular obtenidos para los distintos controles y los diferentes adyuvantes en estudio utilizando la línea celular UMN SAH/DF-1.

Pude observarse en la figura 5 diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la viabilidad de las células resultantes de la exposición de las células de embrión de pollo al AFPL1-1, AFCo1 d-1, AFCo1-2, AFCo1 FT-1, AFCo1 E-1 (máximas

concentraciones de exposición de los adyuvantes) y la viabilidad de la células del control negativo. Sin embargo en esta línea celular no se encontraron diferencias significativas entre el buffer CB1 (máxima dilución) y el control negativo.

Para ambas líneas celulares solo se encontraron citotoxicidad al ser enfrentadas a las máximas concentraciones de los adyuvantes. Estos resultados promueven el uso de los adyuvantes que se evalúan para uso en humanos (AFPL1-25 µg / 100 µL y AFCo1-100 µg/ 100 µL).

Conclusiones

Los resultados del ensayo de viabilidad celular por exclusión del azul tripan mostraron que el AFPL1 a concentraciones menores de 150 µg/mL no presenta efectos tóxicos al ser enfrentado a células de salmón ó células de embrión de pollo. El AFCo1 enfrentado a células de salmón fue tolerado en todas las concentraciones probadas y al ser evaluado en células de embrión de pollo no se observó un efecto citotóxico a concentraciones por debajo de 36,5 µg/mL. Estos estudios de citotoxicidad corroboran los resultados ya obtenidos en otros ensayos de toxicidad que demostraron la baja toxicidad de los adyuvantes AFCo1 y AFPL1.

Figura 1. Placas de 12 pocillos con células UMN SAH/DF1 incubadas con distintas concentraciones de A FCo1d

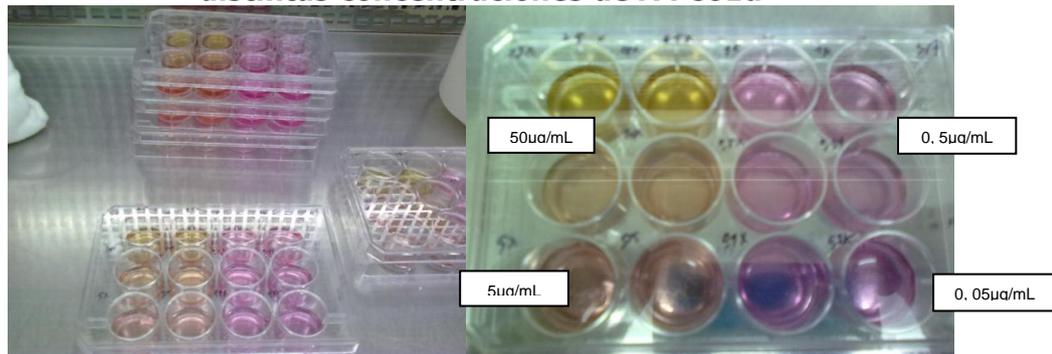


Figura 2. Microfotografía (con un aumento de 10 veces) del efecto citotóxico en células UMN SAH/DF1 tratadas con distintas dosis del adyuvante A FCo1 d (0,5 µg/mL-50 µg/mL). En esta figura se muestra el efecto de A FCo1 d el cual fue el menos tolerado por las células. S/T: sin tratamiento.

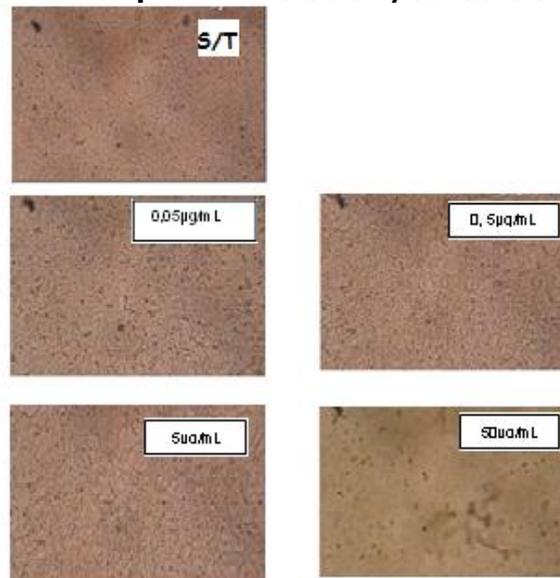


Figura 4. Ensayo de citotoxicidad de adyuvantes en células CHSE-214.
Comparación del control contra grupos experimentales: **AFPL1** (1-1= 150 µg/mL, 1-2= 15 µg/mL, 1-3= 1,5 µg/mL y 1-4= 0,15 µg/mL), **AFCo1d** (d-1= 50 µg/mL, d-2= 5 µg/mL, d-3= 0,5 µg/mL y d-4= 0,05 µg/mL), **AFCo1FT** (FT-1= 36,5 µg/mL, FT-2= 3,65 µg/mL, FT-3= 0,365 µg/mL, FT-4= 0,0365 µg/mL), **AFCo1E** (E-1= 50 µg/mL, E-2= 5 µg/mL, E-3= 0,5µg/mL y E-4= 0,05 µg/mL) siendo significativos para *p ≤ 0.05 (ANOVA).

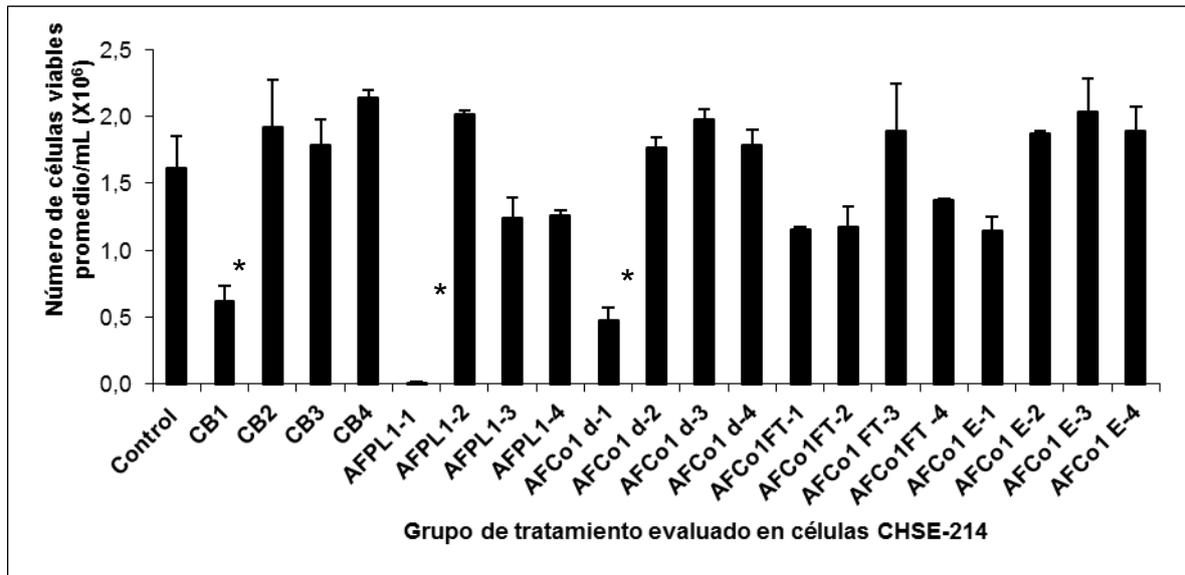
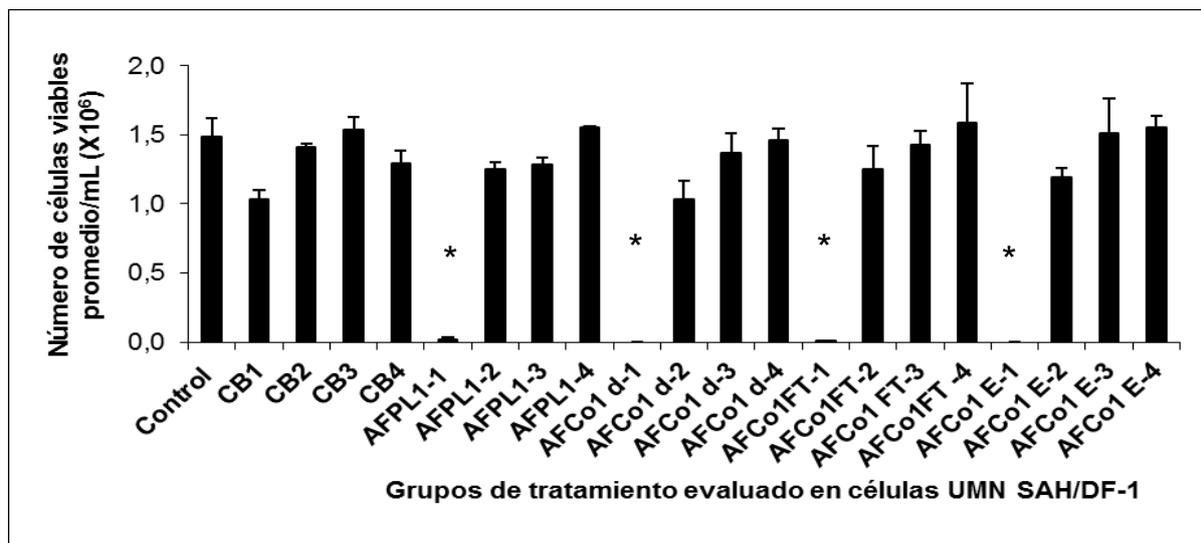


Figura 5. Ensayo de citotoxicidad de adyuvantes en células UMN SAH/DF-1.
Comparación del control contra grupos experimentales: **AFPL1** (1-1= 150 µg/mL, 1-2= 15 µg/mL, 1-3= 1,5 µg/mL y 1-4= 0,15 µg/mL), **AFCo1d** (d-1= 50 µg/mL, d-2= 5 µg/mL, d-3= 0,5 µg/mL y d-4= 0,05 µg/mL), **AFCo1FT** (FT-1= 36,5 µg/mL, FT-2= 3,65 µg/mL, FT-3= 0,365 µg/mL, FT-4= 0,0365 µg/mL), **AFCo1E** (E-1= 50 µg/mL, E-2= 5 µg/mL, E-3= 0,5 µg/mL y E-4= 0,05 µg/mL), siendo significativos para *p ≤ 0.05 (ANOVA).



Referencias Bibliográficas

1. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for development. *Trends in immunology*.2009; 30(1):23-32.
2. Russell MW, Dolvoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek SM. Salivary, nasal, genital and sistemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun* 1996; 64:1272-1283.
3. Bergquist C, Lagergård T, Holmgren J. Anticarrier immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. *Infect. Immun* 1997; 65:1579-1583.
4. McGhee JR. Mucosal immune responses: an overview. In *Mucosal Immunology*, Second Edition, (Ogra PL, Mestecky J, Lamm ML, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, eds.) Academic Press, San Diego, 1999.p. 809-816.
5. Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang A, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 2003; 21:678-683.
6. Harandi AM, Holmgren J. CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infections. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2004; 5(2):141-145.
7. Palomino G, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*. Editorial Universidad de Talca. Talca 2002; 16:300-309.
8. He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJ. Calcium Phosphate Nanoparticles Induce Mucosal Immunity and Protection against Herpes Simplex Virus Type 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9(5):1021-1024
9. Edelman R. An update on vaccine adjuvants in clinical trials. *AIDS Res Hum Retr* 1992; 8:1409-1411.

- 10.** Riva MC, López D. Utilización de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* en la valoración de los efectos de los contaminantes ambientales. Boletín INTERTEX 1993; 104:57-62.
- 11.** Campa C, Sierra V, Gutiérrez MM. Methods of producing Neisseria meningitidis B vaccine, and vaccine produced by methods. United States Patent 1997; Patent number 5, 597572.
- 12.** Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Bracho G, Díaz M, Zayas C, Taboada C. Immune Response Induction and New Effector Mechanisms Possibly Involved in Protection Conferred by the Cuban Anti-Meningococcal BC Vaccine. Infection Immn 2001; 69:4502-4508.
- 13.** Domínguez A, Tamayo M, Pérez I Y, Salas H, Pérez O, Batista A. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. Vaccimonitor v.18 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2009
- 14.** Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G Hernández T, Zayas C, López Y, Díaz D, Acevedo R, Rodríguez N, Lastre M, Fariñas M, del Campo J, Ponce A, Pérez O. Ensayo de inmunogenicidad y toxicidad local del cocleato de Neisseriameningitidis en ratas Sprague DawleyVaccimonitor v.18n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2009.
- 15.** Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. Exptl. Cell res 1958; 15:112-117.
- 16.** Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, Zayas C, Acevedo R, González D, López JA, et al. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. Immunol Cell Biol 2004; 82:603-610.
- 17.** Bracho G, Lastre M, del Campo J, Zayas C, González D, Gil D, Acevedo R, Taboada C, Solís RL, Pérez O. Proteoliposome derived cochleates as novel adjuvant. Vaccine 2006; 24(Suppl 2): 30-31.

18. Zayas C, Bracho G, Lastre M, González D, Acevedo R, del Campo J, Taboada C, Barbera R, Solís RL, Pérez O. Scale up of proteoliposome derived cochleate production. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 2):94-95.
19. Pérez y cols. Patente. Coclaeato con solo MAaMP. Cu/P2011/123.
20. Phillips HJ. Dye exclusion test for cell viability. In: Kruse PF Jr and Patterson MK Jr, editors. *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press; 1973.p.406-408..
21. Tsukerman IM. Non-specific immunologic reactivity among patients with primary multiple malignant neoplasms. *Vopr Onkol* 1976; 22:11-14.
22. Miadelets OD. Changes in the functional activity of macrophages of the skin and regional lymph node after exposure of albino rats to total deep hyperthermia. *Arkh Anat Gistol Embriol* 1989; 96:65-69.
23. Todor IN, Kazmin SD, Susak YaM, Zemskov SV. The influence of glucose, succinate, pH of the medium and higher temperature on the cytotoxic activity of the preparation Ukrain. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:247-252.
24. Aranda M, Reyes M, Ramírez C. Transfección de la línea celular de salmón CHSE-214 usando un liposoma no comercial. *Arch. Med. Vet* 2007; 39(2):173-178.
25. Colmenares C, Sutrave P, Hughes SH, Stavnezer E. Activation of the cski oncogene by overexpression. *J. Virol* 1991; 65:4929-4935.
26. Steven BC, Guoxing Z, Hong CH, Stavnezer E. Nucleic Acids Research Heterodimers of the SnoN and Ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agent 1999; 27(4):1006-1014.
27. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Díaz D. Algunas consideraciones sobre los estudios de inmunotoxicología de un nuevo adyuvante vacunal. *Retel* 2009; 25(2):9-21.

Recibido: 18/01/12

Aceptado: 02/02/12