

Aluminiodun txerto-laguntzaileen eraginaren azterketa sistemen biologiaren bidez

(Studying the signatures of aluminium based vaccine adjuvants by System Biology techniques)

Naiara Abendaño, Martin Bilbao-Arribas, Maitea Ortega,
Endika Varela-Martínez, Begoña M. Jugo*

Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila (UPV/EHU)

LABURPENA: Hamarkadak dira aluminio konposatuak txertoen laguntzaile gisa erabiltzen direla albaritarizan eta giza txertoetan. Laguntzaile horien erabilera oso hedatua egon arren, ez da ongi ezagutzen zein mekanismoren bidez eragiten dituzten ondorio onuragarriak eta, aldizka, kontrako erreakzioak eragin ditzakete. Sistemen biologiako tekniken bidez laguntzaile hauen sinadura molekularra ikertu da, gizakietan zein etxabereetan. Hainbat eragin-mekanismo proposatu dira aluminioaren sistema immunea pizteko ahalmena azaltzeko eta analisi transkriptomikoetan erlazonatutako geneak aurkitu dira. Batzuetan emaitzak kontraesanekoak dira, aktibatzen den erantzun immunea desberdina izan daitekeelako egoeraren arabera. Aluminiogutzen tamainak, formak, propietate fisiko-kimikoez eta antigenoen absortzioak eragina dutela ematen du era berean. Laguntzaile hauek ez dira antigeno-garriatzaile soilak, sistema immunea kitzikatzen duten arrisku-seinale endogenoak pizten baitituzte. Argitzeke dago oraindik haien eragin-mekanismo zehatza eta epe luze-zeko aktibazio immunitarioak sistema immunitarioaren gainestimulazioa eragin dezakeen.

HITZ GAKOAK: Aluminioa, txertoak, laguntzaileak, RNA-seq, ardia, sistemen biologia.

ABSTRACT: Aluminium compounds have been used as adjuvants for years in veterinary and human vaccines, but, despite their widespread use, the mechanism of how aluminium-based adjuvants exert their beneficial effects is still not fully understood and they occasionally can cause adverse reactions. The molecular signature of these adjuvants has been studied by system biology techniques in human and livestock. Transcriptomic analyses have found dysregulated genes linked to some of the proposed mechanisms of action of aluminium. Sometimes the results are contradictory because the immune reaction that is activated may be different depending on the situation. The shape, size, physicochemical properties or antigen absorption of aluminium salts can also have an effect. It seems that aluminium-containing adjuvants are not simple delivery vehicles for antigens, but also induce endogenous danger signals that stimulate the immune system. Whether this contributes to long-lasting immune activation or to the overstimulation of the immune system remains to be elucidated.

KEYWORDS: Aluminium, vaccines, adjuvants, RNA-seq, sheep, systems biology.

* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Begoña M. Jugo. Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU), Sarriena auzoa, zg (48940 Leioa, Bizkaia, Euskal Herria). – begonamarina.jugo@ehu.eus – <https://orcid.org/0000-0002-8033-2317>.

Nola aipatu / How to cite: Abendaño, Naiara; Bilbao-Arribas, Martin; Ortega, Maitea; Varela-Martínez, Endika; Jugo, Begoña M. (2020). «Aluminiodun txerto-laguntzaileen eraginaren azterketa sistemen biologiaren bidez»; *Ekaia*, 38, 2020, 141-153. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.21400>).

Jasoa: 21 urtarrila, 2019; Onartua: 06 apirila, 2020.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2020 UPV/EHU



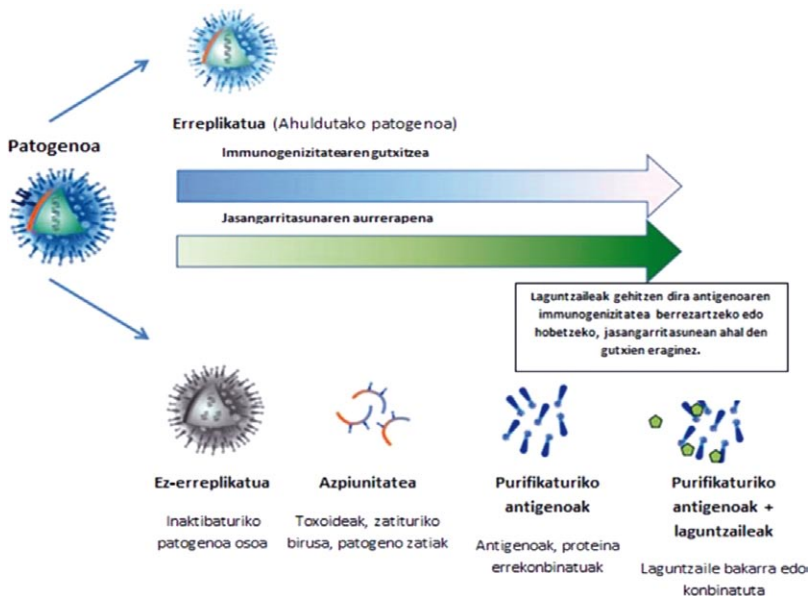
Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

1. SARRERA

1.1. Txertoen eboluzioa

Txertoen lehenengo deskribapena Edward Jenner mediku ingelesak egin zuen 1790eko hamarkadan, giza baztangaren aurrean behi baztangaren birusa inokulatu zuenean, immunizazioaren fenomenoaren aurretik ezaguna bazen ere [1]. Harrezkeroztik, aurrerapen ugari egin dira, eta, gaur egun, txertoak gaixotasun infekziosoen aurkako metodorik eraginkorrenak dira.

Azken hamarkadetatik hona txertoen eraginkortasuna zabal eta sakon ikertu eta egiaztatu da. Gaixotasun infekziosoei aurre egiteko, eritasuna eragiten duen mikroorganismo bera edo horren azpiunitate bat inokulatu da, antigeno deritzona. Historian zehar antigenoak aldatuz joan dira, eta orain 2 estrategia nagusi daude antigenoak erabiltzeko: batetik, patogeno osoak (inaktibatutako edo ahuldutako patogenoak), eta, bestetik, patogeno zatiak (patogeno azpiunitateak eta antigeno purifikatuak), laguntzaileekin edo laguntzailerik gabe [2] (1. irudia). Denborarekin, txertoen immunogenizitatea gutxituz joan da, ahuldutako patogenoren bat erabili beharrean horren azpiunitateren bat erabiltzen delako, eta horrek organismoan duen eragina murrizten du (1. irudia). Immunogenizitatearen gutxi-pen hori laguntzaileen bidez emendatu da, arriskuak murriztuz.



1. irudia. Txertoak erabilitako agente patogenoaren arabera sailkatzen dira. Agente horien artean ahuldutako edo inaktibatutako patogenoak, azpiunitateak, purifikaturiko antigenoak bakarrik edo laguntzaileekin batera daudenak. Pasquale *et al.*-etik moldatua [2]).

1.2. Aluminioa laguntzaile gisa

Laguntzaileen aurkikuntza 1920ko hamarkadan gertatu zen, Alexander Thomas Glenny immunologoak aluminioaren ezaugarri immunoestimulatzailaz ohartu zenean [3]. Aluminioaren gehikuntzak antigorputzen ekoizpena emendatzea lortu zuen eta arrakasta hori dela-eta txertoetako laguntzaile garrantzitsuena jotzen da. Komertzialki eskuragarri dauden aluminio-laguntzaile motak aluminio hidroxidoa, aluminio fosfatoa eta aluminio sulfatoa dira. Haren erabilera giza eta animali txertoetan asko hedatu da (batez ere aluminio hidroxidoa), horien kostua txikia delako eta segurtasun historia luzea dutelako [4]. Gizakian, esaterako, B hepatitiserako, A hepatitiserako, tetanoserako, pneumokokorako edo *H. influenzae* txertoetan erabiltzen da.

Aluminioa antigenoaren efektua iraupen luzekoa izan dadin inokulatzeko da, baina horrek bi arazo ditu: erantzun immunea eragitea arriskurik ez dagoenean eta aluminioa nerbio-sistemara iristea [5]. Nahiz eta 90 urte luzez erabili izan diren, ez dago adostasunik aluminiodun laguntzaileen ekin-tza-mekanismoari buruz, eta ez da guztiz testatu zer eragin kaltegarri izan dezakeen aluminioak ehun edo organo-sistemetan [6].

1.3. Aluminioaren ekintza-mekanismoa

Aluminioak erantzun immune humoral indartsua eragiten du antigenoen espezifikoak diren antigorputzen bidez. Aluminioak laguntzaile gisa duen efektua azaltzeko hainbat mekanismo proposatu dira (2. irudia).

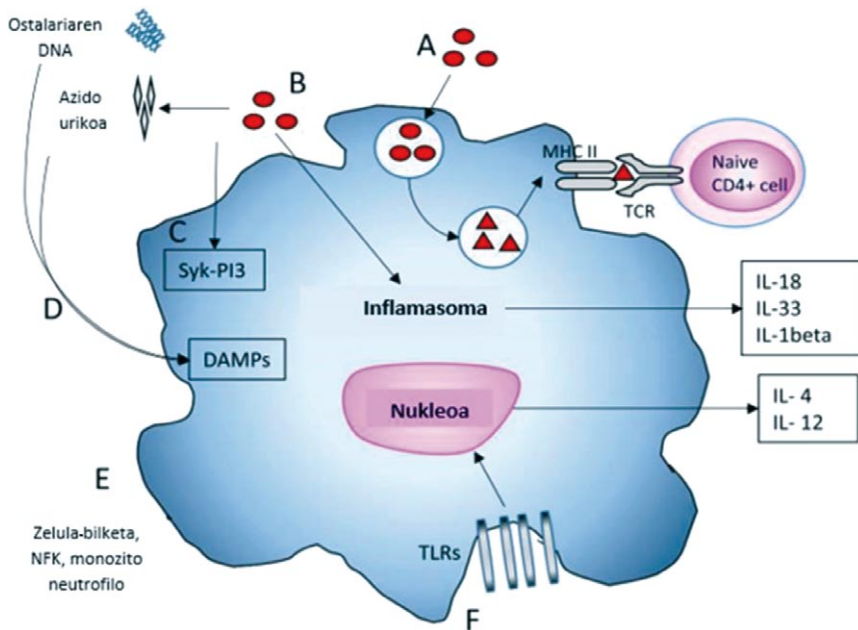
Alde batetik, aluminio laguntzaileak duen ezaugarrietariko bat noduluen eraketa da, txertaketa-gunean sortzen dira, eta antigenoak bertan gordetzen dira epe luzean zehar askatzeko. Noduluen eraketan oinarritutako teoriari «biltegi-teoria» deritzen. Hala ere, ikusi da prozesu hori ez dela ezinbestekoa aluminioak bideraturiko erantzun immunean [7].

Bestalde, NLRP3 inflamasomak aluminioak duen efektuan paper garrantzitsua izan dezake. Ikerketa batean ikusi zuten NLRP3 gutxi zuten saguetan aluminioak eragindako IL1B-ren jariaketaren eta II. klaseko MHC antigenoen adierazpenaren murriztapena gertatu zela aluminioa injektatu eta gero [8]. Gainera, aluminioak bideratutako antigeno espezifikoaren aurkako G1 immunoglobulinak eta nodulu linfatikoetara antigenoak garraiatzen dituzten monozitoen murriztapena gertatu zen. Beste ikerketa batek, aldiz, ez zuen hipotesi horren alde egin, zeren giza serumaren albuminaren injekzio intraperitonealaren ondoriozko aluminio menpeko albuminaren aurkako antigorputzen emendioan ez zen inflamasomaren beharrik izan [9].

Noduluen eta inflamasomaren hipotesiez gain, beste zenbait teoria proposatu dira aluminioaren efektua azaltzeko. Alde batetik, ikusi da zelula-azalean dauden TLR hartzaileak aluminioaren bitartez aktibatu daitezkeela eta horrek NF- κ B estimulatzen duela [10]. Bidezidor horren aktibazioak ze-

lula immuneen transkripzio-programa osoa aldatzen du patogenoen aurka borrokatzeko fenotipo batera pasatzeko [11]. Bestalde, aluminioak interleukina 4-ren (IL4) ekoizpena emendatzen du, zeinak linfzito T laguntzaile bakunak Th2 fenotipora desberdintzatera bultzatzen baititu. Horretaz gain, aluminio-gatzek eragindako azido urikoaren eta DNAREN askapenak kanpoko arrisku-seinale gisa (DAMPs, Damage-associated molecular patterns) joka dezake, erantzun immunea hobetzen duen alarma eta hantura aktibatuz.

Aurreko hipotesiek aluminioaren efektua guztiz azaltzen ez dutenez, azken hipotesi bat plazaratu da, Syk-PI3 kinasaren bidearen aktibazioarekin erlazionatua [12]. Horren arabera, hartzaille-independente den modu batean, aluminioak mintzeko lipidoen berrantolaketa eragiten du [13], Syk-PI3 kinasarekiko independentea den hartzaillea aktibatuz, eta PGE2ren ekoizpena eragiten du, hanturaren bitarteko garrantzitsu bat. Beraz, aluminioak laguntzaile gisa duen papera ulertzeko proposatu diren hipotesi horiek aluminioaren menpeko erantzun immunean parte hartzen seinala desberdin ugari daudela aditzera ematen dute (2. irudia).



2. irudia. Aluminioaren ekintza-mekanismoak. **A.** antigeno biltzeko emendaketa, **B.** inflammasomaren aktibazioa, **C.** azido uriko kristalen bidezko Syk-PI3 kinasaren seinalizazio-bidearen aktibazioa, **D.** zelula hilek jariaturiko DNAREN eta azido urikoaren ezagutza minari elkarturiko molekula-patroien bidez (DAMPs), **E.** zelulen bilteta txertaketa-gunean eta **F.** Toll-like hartzailen aktibazioa. Puntu gorriak: aluminio-gatzak antigenoekin. Triangelu gorriak: antigenoak. Pellegrino *et al.*-etik moldatua [14].

1.4. Aluminioak laguntzaile gisa eragindako kalteak

Aluminioak erantzun immunean dituen onurak frogatzen dituzten ikerketez gain, badira horren aurka egiten dutenak eta aluminioa bezalako konposatuaren erabilerak dituen eragin negatiboak azpimarratzen dituztenak ere [15]. Eragin negatibo horien artean gaixotasun autoimmuneak, eta muskulu eta nerbio-sistemako kalteak daude, segurtasun handiagoko laguntzaileen beharra nabarmendu dutenak [16]. Aluminioak neurotoxikotasuna eragin dezake, hala nola DNAREN egonkortasuna aldatuz, oxigeno espezie errektiboaren emendioa eta neuronen heriotza zelularra bultzatuz [17-19].

Gizakietan, proposatu da aluminioak eragindako sistema immunearen gaineko sustapena dela gaixotasun autoimmune batzuen eragilea. Animalia erduekin egin diren hainbat ikerketak adierazi dutenez, aluminio hidroxidoa duten txertoek ehunetan kalte lokalak sortu eta Miofaszitis Makrofagikoa (MMF), Golkoko Gerraren Sindromea (GWS) eta antzeko aldaketa neurologikoak eragin ditzakete. Horretaz gain, ikusi da aluminioaren eraginpean jartzean giza funtzio neuronalak kaltetu daitezkeela, eta, horrela, aluminio-esposizioa zenbait neuroendekapenezko gaixotasunekin erlazionatu da, besteak beste, alzhemerrarekin, alboko esklerosi amiotrofikoarekin, demenziarekin edo Parkinson gaixotasunarekin [20, 21].

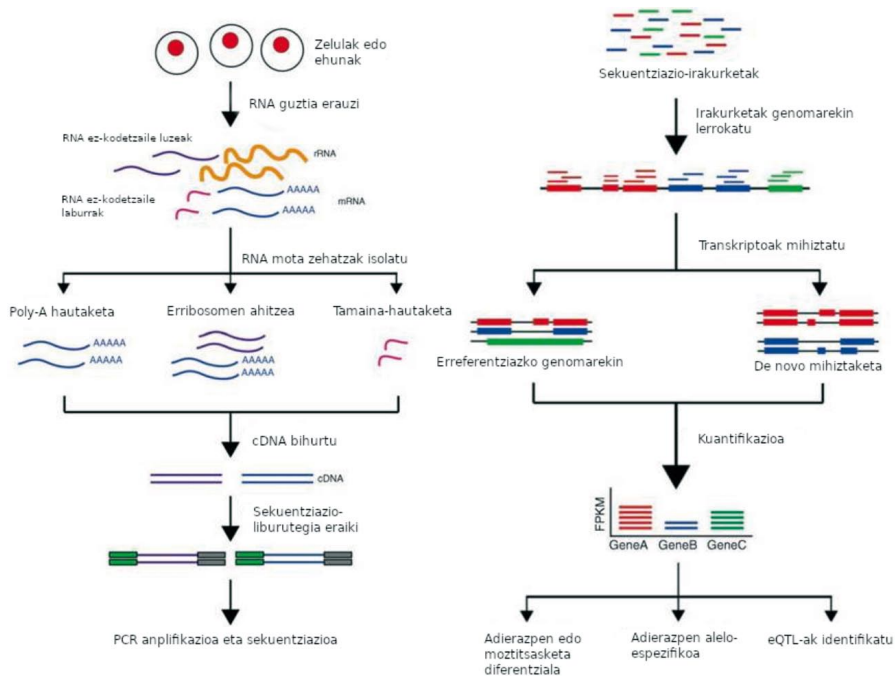
Azken urteetan albaitaritze arloan eginiko ikerketa batzuek aluminio hidroxidoa laguntzaileen bidez induzituriko sindrome autoimmunearekin (ASIA) erlazionatu dute, aluminio hidroxidoa duten txertoen txertaketa jarraituaren ondorio gisa [22]. Luján eta laguntzaileek egindako ikerketan, ardiek kalte neurologikoak eta hantura erreakzioak jasan zituzten. Horrek aluminioaren eragina aztertzeke ardia animalia eredu gisa erabiltzea ahalbidetzen du.

2. TXERTO-LAGUNTZAILEEN SINADURA MOLEKULARRA

2.1. Azterketa molekularreko metodoak: RNA-seq

Gaur egun RNAREN adierazpena aztertzeke teknika nagusia RNAREN sekuentziazioa (RNA-seq) da. Microarray-ak teknika oso erabiliak izan dira genomikan, baina sekuentziazioak lekua kendu dio transkriptomen kuantifikazioa eta analisisa egiteko [23]. Izan ere, sekuentziazioa gai da aztertzeke ehun batean adierazten ari den RNA guztia, hau da, transkriptoma osoa. Gene-adierazpen mailak eta zinetikak informazioa ematen dute immunizazioaren osteko prozesuetan geneen parte-hartzeari buruz. Hala ere, RNA-seq-ak erronka berriak sortu ditu, lortutako datu kantitate handiak metodo konputazionalen bidez tratatu behar direlako software desberdinak erabiliz [24].

RNAren sekuentziario prozesua hurrengoa da (3. irudia): Lehenengo fasean, RNA erauzten da. Bigarren fasean, RNA alderantzizko transkriptasa bidez cDNA bihurtzen da. Azkeneko fasean, cDNA sekuentzia horiek sekuentziatzen dira. Ondoren, analisi bioinformatikoen bitartez sekuentziak erreferentziario genomarekin lerrotzen dira, eta adierazpena kuantifikatzen da.



3. irudia. RNAren sekuentziario (ezkerrean) eta azterketa (eskuinean) prozesua. Lehenengo, RNA ehunik isolatzen da. Bigarren, RNA cDNA bihurtzen da, eta adaptadoreak gehitzen zaizkio muturretan PCR bidez amplifikazioa egiteko. Azkenik, sekuentziarioa egiten da, eta lortutako sekuentziak analizatzen dira. Analiaren lehenengo pausoa lorturiko sekuentziak erreferentziario genomarekin lerrotzean datza. Bigarren pausoa gene bakoitzaren espresio-maila aztertzea da. Azkeneko analisietan, laginen arteko adierazpen desberdintasunen azterketa egiten da. Kukurba *et al.*-etik moldatua [25].

2.2. Sistema mailako hurbiltzeak

Sistema mailako hurbiltzeak hainbat txerto-laguntzailek eragindako erantzun immunea aztertzeke erabili izan dira, horien artean aluminio-gatzak. *In vitro* egindako ikerketek laguntzaileek pizten dituzten markatzaileak zelula mota zehatzetan aztertzeke balio badute ere, sistema immuneke

zelulen arteko elkarrekintzen konplexutasuna dela-eta *in vivo* egindako ikerketak beharrezkoak dira [26].

Laguntzaileek transkriptoman duten eragina microarray bidez aztertu zen lehenbizikoz. Saguen muskuluan injektatutako hainbat txerto-laguntzailearen arteko konparazioan guztiak gene-talde amankomun bat doitzen zuten, zeinak zitokina eta itsaspen-molekulen geneak baitzituen [27]. Hala ere, aluminioak besteek baino ahalmen apalagoa erakutsi zuen sistema immunea pizteko. Beste ikerketa batean ere erakutsi zen aluminioaren ahalmen immunokitzikatzailea txikiagoa zela beste laguntzaileekin konparatuta eta Th2 erantzunaren gene-markatzaileak gainadierazita zeuden [28]. RNA-seq teknika saguen odolean eta nodulu linfatikoetan erabili zuen antzeko ikerketa batean ere, aluminio-gatzek eragin txikiena zuten transkriptoman, nahiz eta amankomunean izan beste laguntzaileekin erantzun immunearekin lotutako geneak eta gongoil linfatikoko B eta T zelulen erantzuna [29].

Transkriptomika eta proteomika uztartuz, aluminioak homeostasiarekin eta sistema immunearekin lotutako geneak doitzen dituela ikusi dute [30]. Gainera, bi mekanismo berriekin erlazionatu dute: IFN γ zitokinaren gainadierazpena, Th1 erantzunaren seinale, eta IFN β zitokinaren gainadierazpena, DAMP seinaleztapenaren eraginez segur aski. Aluminio-gatzek eragindako erantzun immunea Th1 eta Th2 seinaleak edukitzea aurretik deskribatua badago ere [31], horrek konplexutasun handiagoa dakar eragin-mekanismoak argitzeko bidean.

3. ARDIETAN EGINDAKO ESPERIMENTUAK

Euskal Herriko Unibertsitatean egindako ikerketa honetan transkriptomaren sekuentziazio osoa burutu zen ardien odoleko zelula mononuklearen gene-adierazpenak *in vivo* aluminiodun laguntzaileen aurrean nola erantzuten zuten ikusteko [32]. Ikerketa honen berezitasuna da epe luzeko esperimntua izan zela, aluminioaren eragin-mekanismoa aztertzeaz gain txertaketa errepikatuaren segurtasuna ebaluatzea ahalbidetzen duena. Bil-dotsek larruazalpeko injekzio paraleloak jaso zituzten aluminiodun txerto komertzialekin edo aluminio-laguntzaile kantitate baliokidearekin soilik, 16 hilabetez. RNA-seq teknikaren bidez sekuentziatu zen esperimntuaren hasieran eta bukaeran talde bakoitzean. Tratamendu bien ondoren 2.473, 2.980 eta 429 desberdin adierazitako gene identifikatu ziren txertatutako animalietan, laguntzailea jaso zuten animalietan eta bi taldeen arteko konparazioan esperimntuaren bukaeran, hurrenez hurren.

Konparazio bakoitzaren gene esanguratsuenen artean hanturarekin eta erantzun immunearekin erlazionatutakoak zeuden. Txertatutako taldean, DNAREN konponketarekin, zelula barneko seinaleen transdukzioarekin, zitokinen produkzioaren erregulazioarekin eta antzeko terminoekin lotutako

geneak agertu ziren. Aluminio hidroxidoa soilik jaso zuen taldean, DNA kalteei erantzuna, GTPasa aktibitatea, estresaren erregulazioa, proteolisia-ren aktibazioa, apoptosiaren erregulazioa eta antzeko terminoak agertu ziren. Azkenik, bi taldeen arteko konparazioan, zitokinen ekoizpenaren erregulazioarekin, sistema immunologikoaren erregulazioarekin eta hanturazko erantzunarekin lotutako geneak agertu ziren. Adierazpena aldatuta zuten geneak zein bidezidorretan parte hartzen duten ere aztertu zen. Bi tratamenduen amaieran NF- κ B seinaleztapen-bidea gainordezkatuta zegoen. Bestetik, zitokina eta zitokina-hartzaileen azpiadierazpena ikusi zen laguntzaile-dun taldea txertatutako taldearekin konparatzean esperimenduaren bukaeran.

Ikerketa honen arabera, bai txerto komertzialak, bai laguntzailea soilik gai dira modu antzekoan erantzun immunea pizteko, zeina beharrezkoa baita immunizazioa gerta dadin. Dena den, ñabardurak daude tratamenduen artean, zitokinen bidezidor gutxiago eta estres zelularrekin erlazionatutako gene gehiago agertzen baitira aluminioa soilik gehitzean. Horrek erantzun immunearen indukzio apalago bat iradokitzen du aluminioa antigenorik gabe doanean. Gainera, NLRP3 genea azpiadierazita zegoenez aluminio hidroxido laguntzailea jaso zuten ardietan, esan genezake inflammasoma konplexua ez zela beharrezkoa izan erantzun immunea bultzatzeko.

Eztabaida handia dago NLRP3-inflammasomaren premiaz aluminioak eragindako erantzunean [9, 33, 34]. *In vitro*, aluminioak IL1B-ren ekoizpena estimulatu du, eta ekoizpen hori NLRP3-inflammasomaren menpe dagoela dirudi [8, 35]. Aluminioak eragindako erantzun immunean duen eraginari buruz, ordea, egindako *in vivo* ikerketen arabera ez da NLRP3-inflammasoma behar zelula dendritikoak eta linfuzitoak aktibatzeke [9, 35, 36]. Ardietan egindako ikerketak, beraz, azken hipotesi hori sustatzen du.

Animali talde berdinean egindako ikerketa batean txertaketa-osteko noduluak aztertu ziren, aluminioidun txertoen ohiko albo-kalteak [37]. Txerto komertzialek denboran luzeago irauten zuten, eta larriagoak ziren noduluak eratu zituzten. Aluminioak soilik sortutako noduluak, berriz, azkarrago desagertu ziren, aluminio-gatzak beste ehun batzuetara garraiatuak izan zirelako edo gorputzetik garbitu zirelako. Desberdintasun horiek zerikusia izan dezakete erabilitako aluminio-gatzen propietate fisiko-kimikoekin, partikula-tamainekin edo antigenoen eraginarekin [38, 39].

4. ONDORIOAK

Aluminio hidroxidoan oinarritutako laguntzaileak giza eta animali txertotan gehien erabiltzen diren laguntzaileak izanagatik ere, haien ekintza-

mekanismoa ez da guztiz ezagutzen, eta erantzun immunean duen efektua aztertzeko ikerketa-lan gutxi egin dira orain arte. Ikerketa gehienak *in vitro* egin dira, laguntzaileen eragina zelula immuneetan aztertuz. Hala ere, funtsezkoa da zelulen *in vivo* portaera eta halakoek beren ingurunearekin dituzten elkarrekintzak ulertzea aluminio laguntzaileak eragindako erantzunen mekanismoak guztiz argitzeko.

Sistema mailan aztertu direnean, aluminio-gatzentzat proposatu diren eragin-mekanismo desberdinen zantzuak atzeman dira. Batetik, NLRP3 inflamasomaren bidezko erantzuna askotan deskribatua izan den arren, kasu batzuetan ez da aktibazioaren seinalerik ikusi, beharbada animalia eredu desberdinak erabili direlako. Bestetik, estres zelularren markatzaileak lan gehienetan agertzen dira, azido urikozko edo aluminiozko kristalek eraginez izan daitekeena. Zitokinen jariaketa ere aurkitu da, eta horiek erantzun immunea Th1 edo Th2 motara bideratu dezakete. Esperimentuen artean aurkitzen diren desberdintasunak aluminio-gatzen partikulen forma eta tamainarekin erlazionatuta egon daitezke, deskribatuta baitago ezaugarri horiek aluminio-laguntzaileen garraioan eta internalizazioan eragina dutela [31, 39, 40]. Ematen du laguntzaile horiek askotariko bideen bitartez lan egiten dutela; hau da, ez dago mekanismo bakar bat zeinaren bidez sistema immunea pizten ahal duten.

Esperimentu eta teknika horietatik guztietatik lortzen den ezagutza txertoen garapenaren kalitatea hobetzeko, etorkizunean akatsak gertatzeko arriskua murrizteko, txertoen edo laguntzaileen ekintza-mekanismoak ikeritzeko edo laguntzaileek eragindako berezko erantzun immuneak ikertzeko erabil daiteke [26]. Sistema-mailako hurbiltzeen zailtasun handienetako bat datuen kantitate handia da. Hori dela-eta, datuen analisiaren barnean estatistika, irudikapen eta ondorio zuzenak lortzeko tresna eta ezaguera bioinformatiko egokiak beharrezkoak dira. Hurrengo lanei begira, aluminioaren eraginaren ikuspegi oso bat izateko bestelako ehun batzuk aztertzea beharrezkoa da. Izan ere, aluminiodun laguntzaileak antigenoen garraiorako konposatu soilak baino gehiago dira, sistema immunean arrisku-seinaleak piztu baititzakete.

5. ESKER ONAK

Lan hau Nafarroako Agrobioteknologia Institutuarekin eta Zaragozako Unibertsitateko Albaitaritza Fakultatearekin batera izan dugun proiektuari (MINECO: AGL2013-49137-C3-3-R, AGL2013-49137-C3-2-R eta AGL2013-49137-C3-1) esker burutu da. UPV/EHUko doktorego ondoko kontratua du N. Abendañok (ESPDOC16/43) eta UPV/EHUko doktorego aurreko kontratua E. Varela-Martínezek (PIF15/361) eta M. Bilbao-Arribasek (PIF17/306).

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] GROSS, C. P., SEPKOWITZ, K. A. 1998. «The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered». *International journal of infectious diseases*, **3**, 54-60.
- [2] PASQUALE, A., PREISS, S., SILVA, F., GARÇON, N. 2015. «Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond». *Vaccines*, **3**, 320-343.
- [3] GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H., WALLACE, U. 1926. «Immunological notes. XVII-XXIV». *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **29**, 31-40.
- [4] LINDBLAD, E. B. 2004. «Aluminium compounds for use in vaccines». *Immunology and Cell Biology*, **82**, 497-505.
- [5] SHAW, C. A., TOMLJENOVIC, L. 2013. «Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity». *Immunologic Research*, **56**, 304-316.
- [6] TOMLJENOVIC, L., SHAW, C. A. 2011. «Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism?». *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 1489-1499.
- [7] HUTCHISON, S., BENSON, R. A., GIBSON, V. B., POLLOCK, A. H., GARSIDE, P., BREWER, J. M. 2012. «Antigen depot is not required for alum adjuvanticity». *The FASEB Journal*, **26**, 1272-1279.
- [8] KOOL, M., PÉTRILLI, V., DE SMEDT, T., ROLAZ, A., HAMMAD, H., VAN NI-MWEGEN, M., BERGEN, I. M., CASTILLO, R., LAMBRECHT, B. N., TSCHOPP, J. 2008. «Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **181**, 3755-9.
- [9] FRANCHI, L., NÚÑEZ, G. 2008. «The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity». *European Journal of Immunology*, **38**, 2085-2089.
- [10] REED, S. G., ORR, M. T., FOX, C. B. 2013. «Key roles of adjuvants in modern vaccines». *Nature Medicine*, **19**, 1597-1608.
- [11] ZHANG, Q., LENARDO, M. J., BALTIMORE, D. 2017. «30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology». *Cell*, **168**, 37-57.
- [12] MORI, A., OLESZYCKA, E., SHARP, F. A., COLEMAN, M., OZASA, Y., SINGH, M., O'HAGAN, D. T., TAJBER, L., CORRIGAN, O. I., MCNEELA, E. A., LAVELLE, E. C. 2012. «The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses». *European Journal of Immunology*, **42**, 2709-2719.
- [13] FLACH, T. L., NG, G., HARI, A., DESROSIERS, M. D., ZHANG, P., WARD, S. M., SEAMONE, M. E., VILAYSANE, A., MUCSI, A. D., FONG, Y., PRENNER, E., LING, C. C., TSCHOPP, J., MURUVE, D. A., AMREIN, M. W., SHI, Y. 2011. «Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity». *Nature Medicine*, **17**, 479-487.

- [14] PELLEGRINO, P., CLEMENTI, E., RADICE, S. 2015. «On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives». *Autoimmunity Reviews*, **14**, 880-888.
- [15] SHAW, C. A., PETRIK, M. S. 2009. «Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration.». *Journal of inorganic biochemistry*, **103**, 1555-62.
- [16] ISRAELI, E., AGMON-LEVIN, N., BLANK, M., SHOENFELD, Y. 2009. «Adjuvants and autoimmunity». *Lupus*, **18**, 1217-1225.
- [17] BHARATHI, JAGANNATHA RAO, K. S., STEIN, R. 2003. «First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium d-aspartate complex». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **8**, 823-830.
- [18] MORRIS, G., PURI, B. K., FRYE, R. E. 2017. «The putative role of environmental aluminium in the development of chronic neuropathology in adults and children. How strong is the evidence and what could be the mechanisms involved?». *Metabolic brain disease*, **32**, 1335-1355.
- [19] WANG, H., YE, M., YU, L., WANG, J., GUO, Y., LEI, W., YANG, J. 2015. «Hippocampal neuronal cyclooxygenase-2 downstream signaling imbalance in a rat model of chronic aluminium gluconate administration». *Behavioral and Brain Functions*, **11**, 8.
- [20] BONDY, S. C. 2014. «Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration». *Toxicology*, **315**, 1-7.
- [21] EXLEY, C., HOUSE, E., POLWART, A., ESIRI, M. M. 2012. «Brain Burdens of Aluminum, Iron, and Copper and their Relationships with Amyloid- β Pathology in 60 Human Brains». *Journal of Alzheimer's Disease*, **31**, 725-730.
- [22] LUJÁN, L., PÉREZ, M., SALAZAR, E., ÁLVAREZ, N., GIMENO, M., PINCZOWSKI, P., IRUSTA, S., SANTAMARÍA, J., INSAUSTI, N., CORTÉS, Y., FIGUERAS, L., CUARTIELLES, I., VILA, M., FANTOVA, E., CHAPULLÉ, J. L. G. 2013. «Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep». *Immunologic Research*, **56**, 317-324.
- [23] SHENDURE, J., JI, H. 2008. «Next-generation DNA sequencing». *Nature Biotechnology*, **26**, 1135-1145.
- [24] TRAPNELL, C., ROBERTS, A., GOFF, L., PERTEA, G., KIM, D., KELLEY, D. R., PIMENTEL, H., SALZBERG, S. L., RINN, J. L., PACHTER, L. 2012. «Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks». *Nature Protocols*, **7**, 562-578.
- [25] KUKURBA, K. R., MONTGOMERY, S. B. 2015. «RNA sequencing and analysis». *Cold Spring Harbor Protocols*, **2015**, 951-969.
- [26] RAEVEN, R. H. M., VAN RIET, E., MEIRING, H. D., METZ, B., KERSTEN, G. F. A. 2019. «Systems vaccinology and big data in the vaccine development chain». *Immunology*, **156**, 33-46.
- [27] MOSCA, F., TRITTO, E., MUZZI, A., MONACI, E., BAGNOLI, F., IAVARONE, C., O'HAGAN, D., RAPPUOLI, R., DE GREGORIO, E. 2008. «Molecular and cellular

- signatures of human vaccine adjuvants». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10501-10506.
- [28] LAMBERT, S. L., YANG, C. F., LIU, Z., SWEETWOOD, R., ZHAO, J., CHENG, L., JIN, H., WOO, J. 2012. «Molecular and Cellular Response Profiles Induced by the TLR4 Agonist-Based Adjuvant Glucopyranosyl Lipid A». *PLoS ONE*, **7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0051618.
- [29] OLAUSDOTTIR, T. A., LINDQVIST, M., NOOKAEW, I., ANDERSEN, P., MAERTZDORF, J., PERSSON, J., CHRISTENSEN, D., ZHANG, Y., ANDERSON, J., KHOOMRUNG, S., SEN, P., AGGER, E. M., COLER, R., CARTER, D., MEINKE, A., RAPPUOLI, R., KAUFMANN, S. H. E., REED, S. G., HARANDI, A. M. 2016. «Comparative systems analyses reveal molecular signatures of clinically tested vaccine adjuvants». *Scientific Reports*, **6**, 1-14.
- [30] KOOLJMAN, S., BRUMMELMAN, J., VAN ELS, C. A. C. M., MARINO, F., HECK, A. J. R., MOMMEN, G. P. M., METZ, B., KERSTEN, G. F. A., PENNING, J. L. A., MEIRING, H. D. 2018. «Novel identified aluminum hydroxide-induced pathways prove monocyte activation and pro-inflammatory preparedness». *Journal of Proteomics*, **175**, DOI: 10.1016/j.jprot.2017.12.021.
- [31] HE, P., ZOU, Y., HU, Z. 2015. «Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism». *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, **11**, 477-488.
- [32] VARELA-MARTÍNEZ, E., ABENDAÑO, N., ASÍN, J., SISTIAGA-POVEDA, M., PÉREZ, M. M., REINA, R., DE ANDRÉS, D., LUJÁN, L., JUGO, B. M. 2018. «Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mRNA and microRNA transcriptome sequencing». *Frontiers in Immunology*, **9**, 2406.
- [33] GHIMIRE, T. R. 2015. «The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm». *SpringerPlus*, **4**, 181.
- [34] PERRICONE, C., COLAFRANCESCO, S., MAZOR, R. D., SORIANO, A., AGMON-LEVIN, N., SHOENFELD, Y. 2013. «Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects». *Journal of Autoimmunity*, **47**, 1-16.
- [35] LI, H., WILLINGHAM, S. B., TING, J. P.-Y., RE, F. 2008. «Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **181**, 17-21.
- [36] MCKEE, A. S., MUNKS, M. W., MACLEOD, M. K. L., FLEENOR, C. J., VAN ROOIJEN, N., KAPPLER, J. W., MARRACK, P. 2009. «Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, But These Sensors Are Not Required for Alum to Act As an Adjuvant for Specific Immunity». *The Journal of Immunology*, **183**, 4403-4414.
- [37] ASÍN, J., MOLÍN, J., PÉREZ, M., PINCZOWSKI, P., GIMENO, M., NAVASCUÉS, N., MUNIESA, A., DE BLAS, I., LACASTA, D., FERNÁNDEZ, A., DE PABLO, L., MOLD, M., EXLEY, C., DE ANDRÉS, D., REINA, R., LUJÁN, L. 2019. «Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminum Adjuvant-Containing Products in Sheep». *Veterinary Pathology*, **56**, 418-428.

- [38] MOLD, M., SHARDLOW, E., EXLEY, C. 2016. «Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations». *Scientific Reports*, **6**, 1-13.
- [39] SHARDLOW, E., MOLD, M., EXLEY, C. 2017. «From Stock Bottle to Vaccine: Elucidating the Particle Size Distributions of Aluminum Adjuvants Using Dynamic Light Scattering». *Frontiers in Chemistry*, **4**, 48.
- [40] VRIELING, H., KOOIJMAN, S., DE RIDDER, J. W., THIES-WEESIE, D. M. E., SOEMA, P. C., JISKOOT, W., VAN RIET, E., HECK, A. J. R., PHILIPSE, A. P., KERSTEN, G. F. A., MEIRING, H. D., PENNING, J. L., METZ, B. 2019. «Activation of Human Monocytes by Colloidal Aluminum Salts». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1-11.