



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Tesis de grado

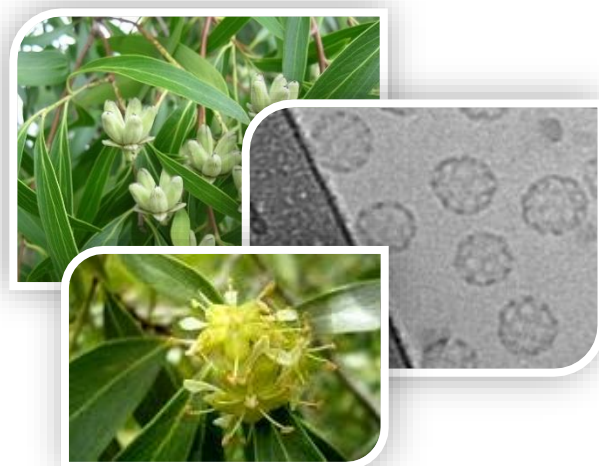
Licenciatura en Ciencias Biológicas plan 2017

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Formulación de nanopartículas tipo ISCOMs con capacidad adyuvante a partir de extracto acuoso de *Quillaja brasiliensis*

Bach. Soledad Sienna Budnik

solesienra@gmail.com



Orientador: Dr. Fernando Silveira

Co-orientadora: Lic. Mariana Rivera

Departamento de
Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene - Facultad de Medicina



Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar

Montevideo, Uruguay

2021

Agradecimientos

Dado el increíble momento de cierre que me convoca a escribir, en los siguientes párrafos agradezco a quienes hicieron posible mi formación profesional y a todos aquellos que influyeron muy personalmente en mí.

Agradezco a mi tutor y co-tutora del presente trabajo Fernando y Mariana por la oportunidad y por la dedicación con la que trabajan. A Norma Suárez (resultados del MALDI-TOF), Iris Miraballes (resultados del DLS) y Gabriela Casanova (imágenes de MET) por su colaboración en ensayos realizados. Al laboratorio de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene por el espacio para desarrollar la presente tesis de grado y el por la gran disposición de todos sus integrantes en todo momento.

Por otro lado, agradezco a mis docentes (a los de todas las etapas), los que realmente se preocuparon por ser conmigo lo que la palabra docente implica desde un lugar de humildad, amor y aprendizaje. Agradezco también a quienes me enseñan día a día a mejorar en mi vocación: mis estudiantes y mis colegas docentes.

Agradecer además a mis compañeros de facultad, los que compartieron un apunte, un ratito de estudio o una charla de mate. A mis amigos, los de ahora y los de siempre, que comparten mis alegrías y son abrazo en mis tristezas. A mi familia siempre apoyándome en lo que me hiciera feliz.

Por último, me agradezco a mí por el esfuerzo, la perseverancia, la valentía y el camino poco convencional construido.

Para cerrar este apartado, agradezco a todos aquellos que tuve la suerte de encontrar y que de una u otra manera me transformaron y me acercaron cada vez más a mí misma. “Somos sujetos históricos situados en esta región, transformados y transformadores...”(1).

Gracias.

Sole.

Resumen

Para potenciar y lograr desencadenar una respuesta inmune con el fenotipo inmunológico deseado muchas vacunas incluyen adyuvantes en su formulación. Las saponinas son compuestos glicosídicos de origen natural cuya capacidad adyuvante es conocida hace más de dos décadas. El equipo de investigación del Dr. Fernando Silveira; tutor de la presente tesis de grado, trabaja en la caracterización y el estudio de la respuesta inmune desencadenada por extractos acuosos (AE) ricos en saponinas extraídos de las hojas del árbol nativo *Quillaja brasiliensis*. El grupo ha reportado que el AE, de fácil producción, tiene la capacidad de inducir potentes respuestas inmunológicas, aunque posee propiedades no deseadas como la generación de hemólisis. Este efecto se ha visto reducido e incluso eliminado al incluir las saponinas en complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) que mejoran además la performance del adyuvante.

En este trabajo se formularon nanopartículas (NPs) tipo ISCOM a partir de AEs producidos en diferentes laboratorios. Los candidatos a adyuvante (AEs y NPs) fueron caracterizados mediante estudios fisicoquímicos (cromatografía en capa fina, espectrometría de masas, microscopía electrónica de transmisión, dispersión de la luz dinámica y ensayo de hemólisis) y empleados en un ensayo de vacunación en ratones CD1.

El ensayo de vacunación se realizó con el objetivo de valorar la actividad adyuvante de AEs y NPs utilizando ovoalbúmina (OVA) como antígeno modélico. Los animales se inocularon con dos dosis (día 0 y 14) de vacunas adyuvantadas con NPs o AEs, y se evaluó la respuesta humoral (IgGtotal) en suero a los días 0, 14 y 28 empleando la técnica ELISA, y la respuesta celular a tiempo final (día 28) mediante la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH).

Tanto los ensayos fisicoquímicos como los ensayos *in vitro* de este trabajo mostraron diferencias y similitudes entre los candidatos a adyuvante. Por otro lado, los ensayos *in vivo* no reflejaron los resultados esperados.

Palabras clave: adyuvante; vacuna; saponina; Quillaja brasiliensis; complejos inmunoestimulantes; nanopartículas; toxicidad; respuesta inmune.

Índice

Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Abreviaturas	1
Introducción.....	3
Vacunas	3
Adyuvantes	4
Saponinas.....	5
Complejos inmunoestimulantes	7
Respuesta inmune mediada por ISCOMs e IMX	8
<i>Quillaja brasiliensis</i>	9
Justificación	10
Objetivos	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
Materiales y métodos	13
1. Obtención de extracto acuoso	13
2. Análisis del extracto acuoso	13
2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	13
2.2 MALDI-TOF.....	14
3. Formulación de ISCOMs e IMX.....	14
4. Análisis de nanopartículas formuladas	16
4.1 Microscopía electrónica de transmisión	16
4.2 Dispersión de luz dinámica	16
5. Análisis de toxicidad in vitro: Ensayo de hemólisis.....	17
6. Ensayo de Vacunación.....	17
7. Evaluación de la respuesta inmune.....	19
7.1 Respuesta celular: Ensayo de hipersensibilidad retardada.....	19

7.2 Respuesta humoral: ELISA.....	19
8. Análisis estadístico	21
Resultados y discusión.....	22
1. Obtención y análisis del extracto acuoso	22
1.1 Cromatografía en capa fina	22
1.2 MALDI-TOF	24
2. Formulación y análisis de nanopartículas.....	26
2.1 Formulación de nanopartículas.....	26
2.2 Microscopía electrónica de transmisión	27
2.3 Dispersión de la luz dinámica	29
3. Análisis de toxicidad <i>in vitro</i> : hemólisis.....	32
4. Ensayo de vacunación	34
5. Respuesta inmune.....	35
5.1 Respuesta celular: DTH.....	35
5.2 Análisis de la respuesta inmune humoral: titulación de anticuerpos mediante ELISA.....	37
Conclusiones.....	40
Perspectivas a futuro.....	45
Bibliografía.	46

Abreviaturas

AE: extracto acuoso rico en saponinas.

AEUy: extracto acuoso rico en saponinas producido en Uruguay.

AEBr: extracto acuoso rico en saponinas producido en Brasil.

APCs: del inglés, *antigen-presenting cells* (células presentadoras de antígeno).

CTLs: linfocitos T citotóxicos.

Chol: colesterol.

DAMPs: del inglés, *damage-associated molecular patterns* (patrones moleculares asociados a daño).

DO: densidad óptica.

dLNs: del inglés, *draining lymph nodes* (ganglios linfáticos drenantes).

DMSO: dimetilsulfóxido.

DLS: del inglés, *dynamic light scattering* (dispersión de la luz dinámica).

DTH: del inglés, *delayed-type hypersensitivity* (hipersensibilidad retardada).

ELISA: del inglés, *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*.

H₂O MQ: agua de calidad milliQ.

HD₅₀: del inglés, *haemolysis dose 50*. Concentración a la que se hemoliza el 50% de glóbulos rojos.

IgG_{Tot}: anticuerpos IgG totales.

IMX: ISCOM-MATRIX™.

ISCOM: del inglés, *immune-stimulating complex* (complejo inmunoestimulante).

MALDI-TOF: del inglés, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (espectrometría de masa).

Mega10: decanoil-N-metilglucamida.

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión.

MetOH: metanol.

MWCO: del inglés, *molecular weight cut-off* (peso molecular límite).

NPs: nanopartículas.

ON: del inglés, *overnight* (durante la noche).

PAMPs: del inglés, *pathogen associated molecular patterns* (patrones moleculares asociados a patógenos)

PBS-T: polietilenglicol sorbitan monolaurato (Tween®) al 0,05% en buffer fosfato salino.

Pc: fosfatidilcolina.

SBA: del inglés, *saponin-based adjuvants* (adyuvantes basados en saponinas).

SE: sin estimular.

ST: saponinas triterpénicas.

TMB: 5,5'-tetrametilbencidina.

Introducción

Vacunas

La vacunación es una de las mejores estrategias para la prevención y el control de múltiples enfermedades infecciosas. Ésta se basa en la generación de una respuesta inmune protectora a partir de la inoculación de compuestos no patogénicos pero inmunogénicos vinculados con el agente causante de enfermedad. Sin embargo, aún no hay vacunas disponibles para muchas de estas enfermedades(2,3).

Las vacunas utilizadas en salud animal son principalmente basadas en patógenos atenuados, patógenos inactivados o en subunidades, como por ejemplo proteínas recombinantes. Las formuladas con patógenos atenuados desencadenan respuestas inmunes similares a las generadas naturalmente por el patógeno, lo que las hace más efectivas en prevenir las enfermedades infecciosas para las que han sido formuladas. La principal desventaja de este tipo de vacunas es que pueden eventualmente revertir a la virulencia y causar enfermedad(4). Las vacunas preparadas con patógenos inactivados son más seguras, pero suelen inducir respuestas inmunes menos potentes que las anteriores, pudiendo no alcanzar la protección deseada(4). Algo similar sucede con las vacunas recombinantes o las vacunas de subunidades, que constan en su mayoría de péptidos/proteínas o polisacáridos que imitan componentes del patógeno causante de enfermedad(5). Estas vacunas son más seguras (no pueden revertir a la virulencia) y además, su composición es altamente purificada y conocida, disminuye la posibilidad de reacciones adversas(6). Sin embargo, en muchos casos estas vacunas son menos efectivas para promover la respuesta inmune buscada dada la pérdida de algunos PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos)(7).

Una estrategia para mejorar la respuesta inmune de las vacunas que lo requieren es la adición de compuestos capaces de potenciarlas y hacerlas más efectivas. Estos compuestos se conocen con el nombre de adyuvantes y fueron descritos por primera vez por Ramón en el año 1924(8).

Adyuvantes

Cuando Gastón Ramón desarrolló la vacuna antitetánica en 1924, observó mejoras en la producción de anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados, fue entonces cuando propuso que la eficacia de la vacuna podía ser mejorada usando además de los antígenos específicos sustancias conocidas como “adyuvantes de inmunidad”(9).

Los adyuvantes más usados en la industria veterinaria son las sales de aluminio y las emulsiones oleosas(3). Estos compuestos potencian la respuesta humoral pero generalmente no son tan efectivos potenciando la respuesta celular. Se ha reportado que pueden mejorar la respuesta frente a patógenos extracelulares, sobre todo de tipo bacteriano, por su capacidad de estimular la respuesta humoral y linfocitos T “helper” (Th) de tipo 2(10,11). Sin embargo, han mostrado poca eficacia para promover respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTLs) y para actuar como inmunomoduladores que favorezcan el perfil de respuesta hacia el tipo Th1 (fenotipo requerido para controlar la mayoría de los patógenos intracelulares).

Además, se ha reportado que los adyuvantes mencionados pueden causar efectos no deseados como reacciones alérgicas y formación de granulomas(10) generando malestar para el animal y pérdidas económicas para la industria.

Otros adyuvantes tales como QS-21, QuilA® e ISCOMs son basados en saponinas (SBA, del inglés *saponin-based adjuvants*), éstos están presentes también en vacunas veterinarias comerciales contra diferentes patógenos como el virus de influenza equina, el parvovirus canino y el virus de leucemia felina(3,10–13).

Las saponinas, usadas desde hace décadas como adyuvantes en vacunas veterinarias, son actualmente consideradas e incluidas en vacunas humanas. Existen dos vacunas humanas licenciadas; una contra herpes zóster (Shingrix™) y la otra contra malaria (Mosquirix™). Estas vacunas contienen la saponina purificada QS-21 como adyuvante(14). El uso más reciente de estas moléculas es contra el patógeno pandémico SARS-CoV-2. Nanoformulaciones conteniendo saponinas se combinan con la proteína recombinante spike para potenciar su

inmunogenicidad(15,16). Esta vacuna superó de forma exitosa ensayos clínicos fase 3(17).

Saponinas

Las saponinas son glicósidos esteroideos o triterpenoideos producidos por el metabolismo secundario de variados vegetales y algunos animales marinos(18). Su estructura química se compone de un núcleo lipofílico, conocido como aglicona, rodeado de residuos oligosacáridicos (hidrofílicos) unidos covalentemente, lo que le atribuyen propiedades anfipáticas(19,20).

Los metabolitos secundarios juegan un rol fundamental en la adaptación al entorno del ser vivo; la síntesis de estas moléculas suele ser en respuesta a factores externos tanto bióticos como abióticos relacionados con situaciones de estrés(18,21). Se cree que el rol natural de las saponinas en vegetales es antimicrobiano, brindando protección al organismo frente a potenciales patógenos(22). Comercialmente fueron conocidas por sus propiedades detergentes, siendo empleadas en cosméticos y productos de limpieza como sustituto natural del jabón por su gran capacidad de formación de espuma(18,23). Posteriormente se descubrió que estas moléculas poseen además una amplia gama de actividades biológicas de las que se destacan: la actividad antitumoral, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, citotóxica e inmunoadyuvante entre otras(20).

Las saponinas producidas por árboles de la clase Magnoliopsida son de tipo triterpénicas (Fig.1)(18). Uno de los géneros que forman parte de esta clase es el género *Quillaja* cuyas saponinas han demostrado poseer capacidad adyuvante(19). En particular QuilA®, una mezcla enriquecida en saponinas obtenida de la corteza del árbol chileno *Quillaja saponaria*, ha demostrado buena capacidad adyuvante y forma parte de algunas de las vacunas veterinarias comerciales mencionadas anteriormente(19,24).

Si bien las saponinas tienen la capacidad de potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno, poseen algunos inconvenientes como su estabilidad en la fase

acuosa dependiente del pH y su alta toxicidad que limitan su uso como adyuvantes(12,25,26).

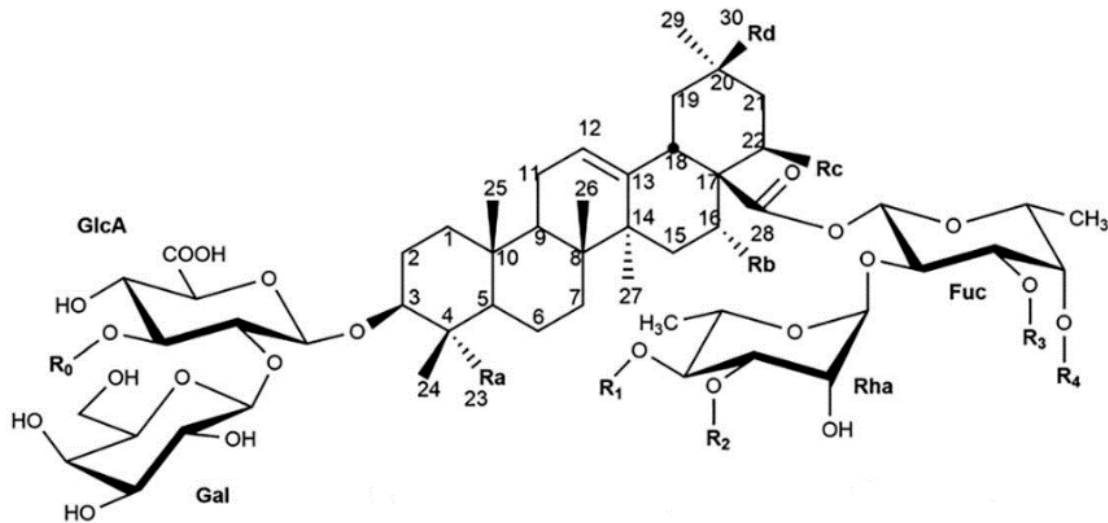


Fig. 1. Estructura química general de saponinas de *Q. saponaria* y *Q. brasiliensis*. Se observa el centro aglicona de tipo triterpenoideo rodeado de residuos sacarídicos. R0-R3 son sustituyentes mono u oligosacarídicos. R4 representa diferentes cadenas acyl. Extraído y adaptado de Wallace F, *et al.* 2019(20).

La lisis celular generada por las saponinas en tejidos animales está relacionada con su toxicidad y se ha visto asociada con reacciones severas en el sitio de inoculación (dolor, ardor, edema, pérdida de pelo)(27). Se ha postulado que este efecto es debido a la interacción de la aglicona (esteroide o triterpenoide) presente en la saponina con el colesterol de la bicapa lipídica, esta interacción (estabilizada por diferentes residuos hidrofílicos del metabolito(25)) lleva finalmente a la formación de poros en la membrana celular con su consecuente lisis. Una forma de evidenciar la lisis celular causada por saponinas es mediante un ensayo de hemólisis *in vitro*.

El efecto hemolítico se ha visto drásticamente reducido e incluso eliminado al incluir las saponinas en la formulación de nanopartículas (NPs) tipo ISCOMs (del inglés, *immune-stimulating complexes*)(28,29). La formación de complejos entre las saponinas y los esteroides del ISCOM, imposibilita su interacción con la bicapa lipídica celular(27) permitiendo aprovechar las capacidades inmunoadyuvantes de estos metabolitos evitando su toxicidad.

Complejos inmunoestimulantes

Los ISCOMs fueron descritos por primera vez por Morein y colaboradores en 1984(30). Están constituidos por saponinas, esteroides (colesterol y fosfatidilcolina) y antígenos. La mezcla de estos compuestos en condiciones y proporciones definidas lleva a la formación NPs con estructura tipo caja de aproximadamente 40 nm de diámetro. Estas NPs son evidenciadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) o alguna de sus variantes (Fig.2)(31,32).

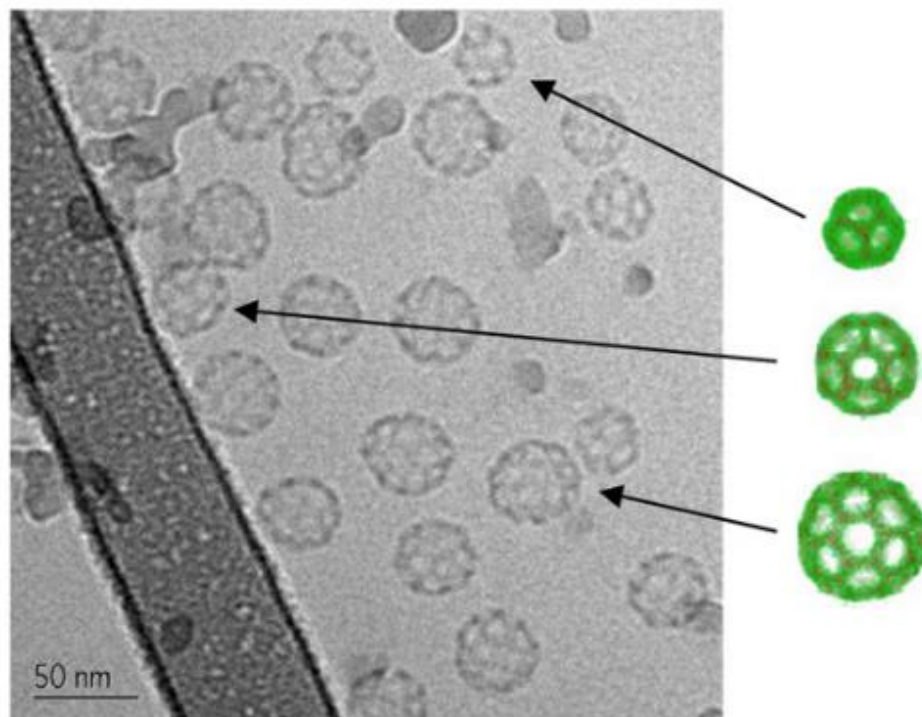


Fig. 2. Imagen de Cryo-MET de ISCOMs en suspensión. La barra escala corresponde a 50 nm. A la derecha se observa el modelado de la estructura de IMX generado a partir de datos obtenidos empleando la técnica de dispersión de rayos X de pequeño ángulo. Extraído y adaptado de Pedersen JS, *et al.* 2012(32).

Las NPs tipo ISCOM pueden formularse sin el antígeno y se les denomina ISCOM-MATRIX™ (IMX). Estas NPs tienen una estructura similar a los ISCOMs(32) así como también su capacidad inmunoadyuvante. Los IMX inoculados junto con el antígeno o inmediatamente en el mismo sitio son capaces de promover robustas respuestas inmunológicas contra éste(33). La principal ventaja de los IMX frente a los ISCOMs es que posibilitan la generación de una plataforma amplia para la formulación de vacunas contra diferentes

patógenos(27) sin la necesidad de estar asociadas a un antígeno en particular(34). Esto permitiría producir una mayor cantidad del adyuvante para emplearse en diferentes formulaciones cuando sea necesario, lo que es beneficioso en términos de tiempo y costos de la producción industrial del producto.

Existen vacunas comerciales que contienen ISCOMs como adyuvante formulados con QuilA[®](35,36); la mezcla comercial enriquecida en saponinas mencionada anteriormente. Las saponinas son moléculas complejas, y muy difíciles de aislar en estado puro, por lo que mayoritariamente se trabaja (incluso a nivel comercial) con fracciones purificadas que contienen mezclas de estas(14).

Respuesta inmune mediada por ISCOMs e IMX

Morelli *et al.* (2012) han propuesto que las vacunas adyuvadas con ISCOMs producen una doble oleada de presentación de antígeno por células presentadoras (APCs), esto se debe a que existen dos vías de llegada de las NPs a los ganglios linfáticos drenantes (dLNs). En primer lugar, los ISCOMs trafican directamente desde el sitio de inoculación hacia los dLNs por el torrente linfático, donde son capturados y presentados por APCs residentes; una segunda oleada se produce cuando las APCs arriban a los dLNs desde el sitio de inoculación donde han internalizado los componentes de la formulación vacunal. La “doble oleada” permite asegurar una presentación del antígeno continua y prolongada(37).

Por otro lado, se ha demostrado que los ISCOMs inducen la presentación cruzada mediante la formación de cuerpos lipídicos(38), por lo que los antígenos podrían ser presentados en el contexto de MHC de clase II y I produciendo la activación de células TCD4⁺ y TCD8⁺ respectivamente. Esto último permite la generación de anticuerpos y células TCD8⁺ específicas brindando protección al organismo frente a patógenos intracelulares y extracelulares(39–41). Por consiguiente, las células TCD4⁺ se diferencian principalmente hacia fenotipos Th1 y Th2 con polarización hacia Th1. Las células Th1 son típicamente

productoras de IFN- γ y TNF α y las células Th2 de IL-4, IL-5 e IL-13 por lo que tiene sentido encontrar éstas citoquinas en el suero de animales inoculados con candidatos vacunales conteniendo estos adyuvantes(42,43).

La respuesta humoral generada por vacunas formuladas con IMX es potente y persistente en el tiempo, lo que sugiere la generación de plasmocitos de larga vida media y linfocitos B de memoria(37). Los isotipos de los anticuerpos producidos son variados y están determinados principalmente por las citoquinas producidas por células Th1 y Th2(44).

Quillaja brasiliensis

En la última década el equipo de investigación, liderado por el Dr. Fernando Silveira (tutor del presente trabajo de tesis) ha estudiado saponinas con propiedades similares a QuilA[®] obtenidas a partir de extractos foliares de otra especie del género *Quillaja* presente en nuestro país: *Q. brasiliensis* (Fig. 3).

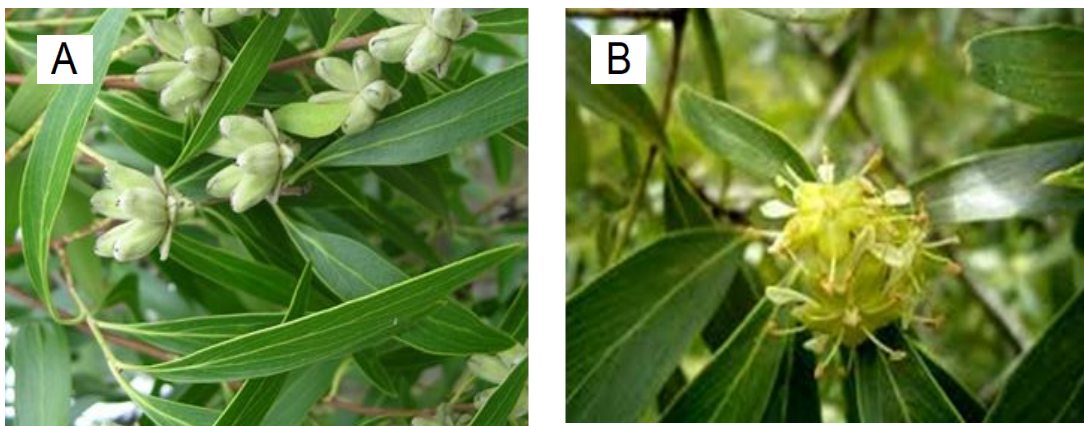


Fig. 3. Fotografía de *Quillaja brasiliensis*. Se muestra la morfología del fruto (A), flor (B) y hojas de la especie (A y B). Extraído y adaptado de Fern K., 2014 (45).

Al ser analizadas por MALDI-TOF (espectrometría de masa), fracciones ricas en saponinas de *Q. brasiliensis* y QuilA[®] mostraron patrones espectrales y picos característicos de escisión similares, lo que respalda la similitud química entre las saponinas presentes en las dos especies de *Quillajaceae* (*Q. brasiliensis* y *Q. saponaria*)(35,46).

Quillaja brasiliensis es un árbol autóctono del Norte del territorio Uruguayo, el Sur de Brasil, el Noreste Argentino y el Este de Paraguay(47). Las saponinas extraídas de las hojas de *Q. brasiliensis* han demostrado desencadenar respuestas inmunes tan potentes como QuilA® pero con menores efectos secundarios(46,48). Además, desde el punto de vista ecológico su uso es beneficioso ya que se emplean las hojas y no la corteza del vegetal para su obtención. De esta manera no es necesario talar los árboles para conseguir la materia prima(49).

El proceso de obtención de saponinas está mediado por diferentes pasos de purificación a partir de las hojas del árbol *Q. brasiliensis*. En primer lugar, se obtiene el extracto acuoso (AE). Posteriormente el AE puede purificarse mediante cromatografía en columna de sílica, produciéndose así distintas fracciones ricas en saponinas que contienen a su vez menor cantidad de impurezas (compuestos fenólicos y taninos entre otras).

Aunque la obtención del AE es sencilla, la purificación de las fracciones es un proceso largo, tedioso, costoso y de bajo rendimiento(50). La generación de complejos inmunoestimulantes formulados directamente con AE de *Q. brasiliensis*, significaría la obtención de un adyuvante de bajo costo y menor daño ambiental con posibles aplicaciones en la industria veterinaria(11).

Justificación

El equipo del Dr. Fernando Silveira tiene amplia experiencia en la investigación sobre las propiedades adyuvantes de las saponinas(31,33–36), así como también de la actividad inmunológica que promueven los complejos inmunoestimulantes generados con estos productos bioactivos(28,35,53).

Para esta tesis de grado se plantea continuar profundizando en el conocimiento sobre la producción de extractos acuosos derivados de árboles nativos del territorio uruguayo (*Q. brasiliensis*). Es por tanto imprescindible comparar los extractos uruguayos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, con extractos acuosos obtenidos en Brasil por nuestros colaboradores de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur (UFRGS).

En el presente trabajo, se compararán características de los extractos de Uruguay y Brasil tales como: generalidades de su composición, capacidad de formación de nanopartículas, efecto hemolítico, respuesta inmune humoral y celular generada al ser empleados como adyuvantes en sí mismos o en nanopartículas, entre otras. Como control se emplearán saponinas comerciales de *Q. saponaria* (QuilA® Brenntag). El antígeno modélico ovoalbúmina (OVA) será empleado en los ensayos *in vivo*. OVA es usado comúnmente en el estudio de adyuvantes(28) por generar una respuesta inmune detectable que se encuentra bien caracterizada y por ser de sencilla adquisición comercial.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar las nanopartículas tipo ISCOMs e IMX producidas en base a AEs de *Q. brasiliensis* como candidato adyuvante.

Objetivos específicos

- Obtener AE a partir de hojas de *Q. brasiliensis* de Uruguay (AEUy).
- Caracterizar y comparar el AEUy obtenido con AE de Brasil (AEBr) y saponinas comerciales (QuilA®).
- Formular NPs tipo ISCOM e IMX a partir de AEUy, AEBr y QuilA®.
- Caracterizar las NPs formuladas.
- Comparar la respuesta inmune humoral y celular generada por los candidatos a adyuvante en modelo murino utilizando OVA como antígeno.

Materiales y métodos

1. *Obtención de extracto acuoso*

Para la obtención de extracto se siguió el protocolo descrito por Yendo A, 2016 (50). Brevemente, las hojas colectadas en Parque Batlle, Montevideo (34°53'40.9"S 56°09'19.2"W) en abril 2018(49) se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 40°C durante una semana. Posteriormente, se molieron las hojas secas y 100g de este producto se colocó en agitación a 4°C con agua ultrapura (H₂O MQ). El extracto se filtró con papel de filtro (Whatman) utilizando una bomba de vacío. En este punto se obtuvo un líquido traslúcido de color caramelo. Para precipitar los taninos presentes en la solución se agregaron 100 mL de gelatina al 2% p/v en H₂O MQ tibia. Poco tiempo después la solución se tornó menos traslúcida y se filtró nuevamente por papel de filtro. Finalmente, se procedió a eliminar impurezas mediante la adición del solvente orgánico acetato de etilo observándose la formación de dos fases. Este procedimiento se realizó dos veces y posteriormente la fase coloreada se repartió en frascos y se liofilizó. El producto obtenido se denominó AEUy (extracto acuoso de *Quillaja brasiliensis* producido en Uruguay).

2. *Análisis del extracto acuoso*

2.1 *Cromatografía en capa fina (TLC)*

Siguiendo el protocolo descrito por Yendo A, 2016(50), se preparó una suspensión 5 mg/mL de los AE en metanol (MetOH) y se sembraron 100 µL sobre una placa de sílica gel (ALUGRAM, MACHEREY-NAGEL) dejando 1 cm de separación entre cada muestra. La placa se secó al aire. Dentro de una campana de extracción de gases se sumergió en la fase móvil orgánica butanol:ácido acético glacial:agua destilada en proporción 5:1:4 (v/v/v). Las muestras ascendieron por capilaridad. Luego de 50 min se retiró la placa de la campana para proceder a su secado y posterior revelado. Para el revelado, se humedeció totalmente la placa con un algodón embebido en p-

anisaldehído:H₂SO₄:MetOH en proporción 1:4:95 (v/v/v) (como revelador de triterpenos y esteroides) y posteriormente se quemó con pistola de calor.

2.2 MALDI-TOF

Los extractos de saponinas usados en la presente tesis (AEUy, AEBr y Quil-A[®]) fueron parcialmente caracterizados por espectrometría de masas técnica MALDI-TOF (del inglés, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) usando el equipo del Instituto de Higiene, UdelaR. Las espectrometrías fueron realizadas por la Dra. Norma Suárez, docente de nuestro departamento.

Los ensayos MALDI-TOF fueron realizados en una placa Microflex LR MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, EEUU) con láser nitrógeno de 337 nm en modalidad ion positivo lineal con extracción retardada optimizado en el rango m/z de 0–20 kDa. Las calibraciones fueron realizadas con una mezcla de calibración estándar para péptidos (Bruker Daltonics). El láser fue disparado cien veces en cada uno de los diez puntos por muestra en la placa de 96 pocillos para un total de 1000 disparos por muestra con 30% de intensidad.

Para las muestras se mezcló en relación 1:1 una solución de AEUy 1 mg/mL, AEBr 1 mg/mL o QuilA[®] 1 mg/mL con la solución matriz (ácido 2,5-dihydroxybenzoico 10 mg/mL en H₂O MQ con 1% TFA). La mezcla se preparó sobre una placa de acero inoxidable de 96 pocillos y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min para luego ser analizada.

3. Formulación de ISCOMs e IMX

Los ISCOMs e IMX empleados en el presente trabajo de tesis se formularon utilizando el método de diálisis descrito por Mowat y Reid (1995)(54). Brevemente, se preparó una solución de decanoil-N-metilglucamida (Mega10, 85261-20-7 Sigma-Aldrich) en H₂O MQ al 20% a la que se agregó 100 mg/mL de colesterol (Chol, cat. n° C 8667 Sigma, USA) y 100 mg/mL de di-palmitoil fosfatidilcolina (Pc, Avanti Polar Lipids, USA) en cloroformo. A esta solución la denominamos “LipidMix”.

Se preparó una solución de 1,65 mg/mL de OVA (Sigma cat nº A-5253) en buffer Tris/NaDOC con NaDOC al 2% (p/v). Por cada mililitro de solución de OVA se agregaron 100 µL de LipidMix. El cloroformo se removió por calor (45°C) en constante agitación hasta que la solución se tornó transparente. Para la formulación de IMX se sustituyó el volumen de antígeno por H₂O MQ.

Luego, se agregó a la solución anterior AE suficiente para alcanzar una concentración de 3 mg/mL en solución alcanzando una relación molecular aproximada AE:Chol:Pc de 3:1:1. Para optimizar IMX-AEUy se testeó en una segunda instancia la relación 5:1:1.

Se dializó la solución obtenida utilizando una membrana de diálisis 12,000-14,000 Da MWCO (del inglés, *molecular weight cut-off*) a 4°C en agitación durante tres días contra 10 L de buffer de diálisis (Tris-Cl 50mM; pH 8.5) con 0,001% de timerosal como conservante. Se cambió el buffer cada 12hs y posteriormente se removió el timerosal mediante diálisis en las mismas condiciones durante 20 h contra 10 L de PBS.

Finalmente se obtuvieron seis formulaciones de nanopartículas (Tabla 1) en dos instancias diferentes. Dados los tiempos del proyecto, para el ensayo con animales fueron empleadas las formulaciones de la primera instancia.

Tabla 1. Formulaciones micelares producidas. Se detallan los componentes de cada formulación (extracto rico en saponinas, colesterol (Chol), fosfatidilcolina (Pc) y ovoalbúmina (OVA)) y la relación entre ellos. Las primeras tres corresponden a la primera instancia de formulación y las demás a la segunda instancia.

Formulación	Instancia	Extracto acuoso	Chol	Pc	OVA
ISCOM-AEUy	1era	AEUy - 3	1	1	1,5
ISCOM-AEBr		AEBr - 3	1	1	1,5
IMX-AEUy		AEUy - 3	1	1	-
IMX-AEUy25	2da	AEUy - 5	1	1	-
IMX-AEBr		AEBr - 3	1	1	-
IMX-Quil-A®		QuilA® - 3	1	1	-

4. Análisis de nanopartículas formuladas

4.1 Microscopía electrónica de transmisión

Se analizaron las formulaciones de nanopartículas en la Unidad de MET de Facultad de Ciencias, UdelaR por la Dra. Gabriela Casanova quien es responsable de la misma.

Las muestras se diluyeron en PBS según muestra la Tabla 2. Una alícuota de 10 μ L de cada muestra se sembró en una grilla formvar/carbón (200 mesh). Luego de dos minutos se retiró el exceso de muestra y se dejó secar la grilla por completo para posteriormente teñirse con acetato de uranilo al 2%. Las muestras fueron analizadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL (JEMM 10.10) a un voltaje de aceleración de 80 kV.

Tabla 2. Dilución de las muestras analizadas en MET.

Muestra	ISCOM-AEUy	ISCOM-AEBr	IMX-AEUy	IMX-AEUy25	IMX-AEBr	IMX-QuilA®
Dilución	1/1	1/1	1/1	1/5	1/5	1/10

4.2 Dispersión de luz dinámica

El diámetro hidrodinámico de IMX-AEUy25, IMX-AEBr e IMX-QuilA® (producidas en la segunda instancia de formulación) se evaluó usando el método de dispersión de la luz dinámica (DLS). La técnica fue llevada a cabo por la Dra. Iris Miraballes en el Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP).

La DLS se realizó con el sistema Malvern Zetasizer (Malvern, USA) usando laser He-Ne de polarización vertical ($\lambda=632,8$ nm) como fuente de luz. Se midió el potencial Zeta mediante electroforesis laser-Doppler (LDE) con el instrumento descrito. El potencial Zeta y la distribución de tamaño fueron tomadas como el promedio de diez mediciones consecutivas. Todas las mediciones fueron realizadas a una temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

5. Análisis de toxicidad *in vitro*: Ensayo de hemólisis

Se evaluó la toxicidad *in vitro* de los adyuvantes obtenidos: ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr, IMX-AEUy, AEUy y AEBr mediante el ensayo de hemólisis.

Para este ensayo se empleó el protocolo descrito en Silveira *et al.*, 2011(55) con algunas modificaciones. En primer lugar se prepararon diferentes concentraciones (10 - 3000 µg/mL) en PBS de los adyuvantes a ensayar (ISCOMAEUy, ISCOMAEBr, IMXAEUy, AEUy y AEBr). Como control positivo (100% de hemólisis), se utilizó una solución de QuilA[®] 250 µg/mL y como control negativo (0% de hemólisis) se incluyó PBS.

En una placa de 96 pocillos de fondo curvo se incubaron 20 µL del adyuvante en diferentes concentraciones (10 - 3000 µg/mL) con 180 µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo al 1% durante 30 min a 37°C; las muestras se sembraron por cuadruplicado. La placa se centrifugó a 1500 G durante 5 min. Luego, 75 µL de sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro de placas a 450nm.

Se determinó el efecto hemolítico (porcentaje de hemólisis) de cada solución tomando como referencia al control positivo (QuilA[®] 250 µg/ml) como 100% de hemólisis y al control negativo (PBS) 0% de hemólisis.

6. Ensayo de Vacunación

Para evaluar la respuesta inmune desencadenada por formulaciones conteniendo los adyuvantes de interés se realizó un ensayo de vacunación en modelo murino. Las vacunas fueron formuladas en condiciones de esterilidad; todos sus componentes (Tabla 3) se encontraban previamente esterilizados por filtración (Minisart[®] Syringe Filter 0,22 µm, S6534-FM0SK).

El ensayo fue realizado en ratones hembra cepa CD1 de 6-8 semanas de edad criados y mantenidos durante todo el ensayo en el bioterio del Instituto de Higiene bajo condiciones controladas: temperatura (22 ± 2 °C); humedad; ciclo de luz/oscuridad 12/12 hs; comida y agua *ad libitum*.

Tabla 3. Composición de las formulaciones vacunales inoculadas a cada grupo de ratones.

Grupo	Nombre del grupo	Adyuvante (10 µg)	Antígeno (5 µg)
1	ISCOM-AEUy	ISCOM-AEUy	OVA
2	ISCOM-AEBr	ISCOM-AEBr	OVA
3	IMX-AEUy	IMX-AEUy	OVA
4	AEUy	AEUy	OVA
5	AEBr	AEBr	OVA
6	OVA	-	OVA
7	PBS	-	-

El experimento se llevó a cabo siguiendo el esquema representado en la Figura 4. Los ratones se inmunizaron con dos dosis (priming y booster) de 0,1 mL de la formulación vacunal (tabla 3) los días 0 y 14 por vía subcutánea. Los animales fueron divididos en 7 grupos (n=5) según la formulación vacunal empleada (tabla 3). Los grupos se denominaron según el componente de la vacuna de mayor relevancia para nosotros (ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr, IMX-AEUy, AEUy, AEBr, OVA, PBS). Los controles incluidos fueron, grupo antígeno (OVA) y grupo salino (PBS). Cada dosis contenía (si corresponde según el grupo) 5 µg de OVA y 10 µg de AE; como vehículo se utilizó PBS en todos los casos. Las concentraciones empleadas fueron seleccionadas tomando como referencia ensayos anteriores(28,46).

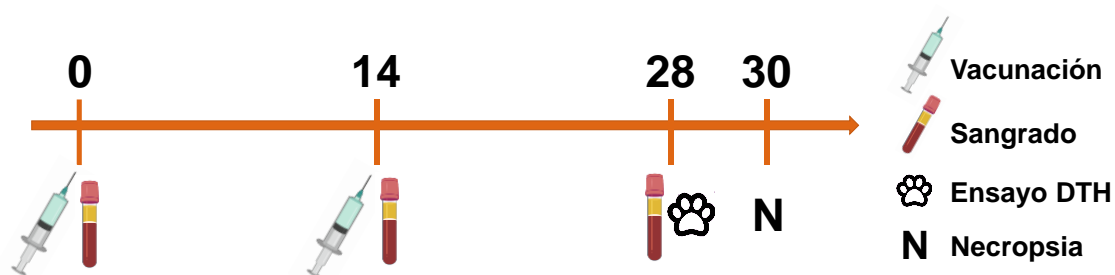


Fig. 4. Esquema de vacunación. Se observa: inmunización con dos dosis vacunales a los días 0 y 14. Extracción de sangre a los días 0, 14 y 28. DTH al día 28 y necropsia (N) al día 30.

Se llevaron a cabo sangrías periódicas por la vena retro-orbital de los animales los días 0, 14 y 28. Además, el día 28 se llevó a cabo la inoculación del antígeno

para el ensayo de DTH. Finalmente, luego de obtener los resultados del ensayo de DTH el día 30 posterior al priming los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical.

El ensayo y tratamiento de los animales durante todo el experimento se realizó según el protocolo de ética N°070153-000531-13 aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

7. Evaluación de la respuesta inmune

7.1 Respuesta celular: Ensayo de hipersensibilidad retardada

Con el fin de evidenciar la inmunidad celular antígeno específica se realizó un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH; del inglés, *delayed-type hypersensitivity*). Al día 28 del ensayo de vacunación los animales fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda con 1 µg de OVA en 10 µL de PBS empleando una jeringa Hamilton. Se tomaron medidas del espesor de la pata con un calibre luego de 24 hs(56).

Una reacción DTH se evidencia cuando existe un aumento en el espesor de la pata inoculada (vinculado con reclutamiento celular específico) en relación al promedio del grupo control (PBS).

7.2 Respuesta humoral: ELISA

Para evaluar la respuesta humoral de anticuerpos específicos anti-OVA se titularon los anticuerpos IgGtotales (IgG_{Tot}) en suero de los animales inmunizados a los días 0, 14 y 28 del ensayo de vacunación utilizando la técnica de ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) descrita en investigaciones anteriores(28).

Brevemente, se obtuvo el suero de la sangre extraída los días 0, 14 y 28 del ensayo. Para ello, la sangre se colocó 20 minutos a 37°C y 20 min a 4°C. Luego se centrifugó durante 5 min a 8000 G y se extrajo el suero. El suero se conservó a -20°C hasta su uso.

Para el ensayo de ELISA, se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 wells (cat n°655061 Greiner bio-one) ON (del inglés, *overnight* (durante la noche)) en cámara húmeda a 4°C con 100 µL/well de OVA (5 µg/ml) en 0,05 M buffer acetato pH=5. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una solución de PBS-T y posteriormente se bloqueó con 200 µl/well de PBS 1% Tween®20 durante 2 horas en cámara húmeda a 37 °C. Se realizaron 3 lavados como se describió anteriormente y se incubaron 100 µl/well de diluciones apropiadas de los sueros en PBS-T 0,01%. El rango de dilución de los sueros fue de 1/50 a 1/128.000 según la muestra. En cada placa se incluyó una curva de calibración para la cual se usaron diferentes diluciones de un pool de sueros extraídos el día 14 y el día 28. Luego de la incubación se lavó como fue descrito, y se colocaron 100 µl/well del anticuerpo anti-mouse IgG_{Tot} conjugado a la enzima peroxidasa (cat n°1030-05 SouthernBiotech) diluido 1/10.000 en PBS-T 0,01%. La placa se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se lavó y se procedió a agregar 100 µl/well de solución de revelado: 6 mg/mL de 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en dimetilsulfóxido (DMSO) en 0,1M buffer de acetato de sodio pH. 5.5. Como sustrato para la enzima se empleó peróxido de hidrógeno al 1%. La placa se incubó durante 20 min en oscuridad y temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se frenó con 100 µl/well 1N de ácido sulfúrico. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos en un espectrofotómetro de placas (Sunrise Tecan) a una longitud de onda de 450nm.

Para determinar el título de anticuerpos se tomó la DO de la dilución 1/1000 de la curva de calibración como 1 unidad arbitraria (UA), a la DO de la dilución 1/2000 de la curva se le asignan entonces 0,5 UA y así sucesivamente con todas las diluciones. Una vez establecidas las UA de la curva de calibración éstas se graficaron en función del DO de cada una. Utilizando la ecuación de la recta; respetando el rango lineal de la curva, se obtuvo el valor de UA para cada muestra y luego se multiplicó por la dilución de los sueros.

8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos (hemólisis, DTH y ELISA) se analizaron mediante la prueba Kruskal-Wallis con el post-test de Dunn para comparaciones múltiples. En el ensayo de ELISA se aplicó además, el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Para los test aplicados, las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con $p \leq 0,05$.

Las pruebas fueron ejecutadas empleando el programa GraphPad Prism versión 8.0 de GraphPad Software.

Resultados y discusión

1. Obtención y análisis del extracto acuoso

A partir de 100 g de hojas secas de *Q. brasiliensis* se obtuvo AE según lo indicado en el procedimiento de Yendo A, *et al.*, 2016. Se observó la formación de espuma durante el proceso de obtención y al utilizar el extracto, lo que es indicativo de la presencia de saponinas en el mismo(15,17).

Posterior a la liofilización del producto, se obtuvieron 15,3 g de AEUy resultando en un rendimiento total del 15,3% (masa de AE/ masa de hojas secas). El AE obtenido fue analizado mediante cromatografía en capa fina (Fig. 5) y MALDI-TOF (Fig. 6) obteniéndose los resultados mostrados más adelante en el texto.

1.1 Cromatografía en capa fina

AEUy fue analizado y comparado con AEBr y QuilA[®] mediante cromatografía en capa fina (TLC) usando el protocolo de Yendo A, *et al.*, 2016. El anisaldehído-ácido usado en la etapa de revelado es un revelador universal que produce diferentes colores según el compuesto con el que reacciona.

El resultado de la cromatografía mostró similitudes y diferencias entre las tres muestras (Fig. 5). En primer lugar, para AEBr se revela una única banda intensa con coloración azul. En segundo lugar, para QuilA[®] se observan tres bandas, la primera de color verde y las dos siguientes azuladas. Por último, para AEUy se definen cinco bandas de diferentes tonalidades; la primera y la tercera son morado-amarronadas, la segunda y la cuarta amarillas y la quinta banda es verde.

En todas las muestras se observan bandas de color azul-violeta-marrón a una distancia similar de la línea de siembra (Fig. 5). Estas bandas corresponden a saponinas triterpénicas (ST)(50) típicamente producidas por la clase Magnoliopsida a la cual pertenece el género *Quillaja*(18). En el caso de AEBr esta banda se muestra más intensa lo que podría indicar mayor concentración de ST en el extracto, aunque no podemos asegurarlo mediante esta técnica.

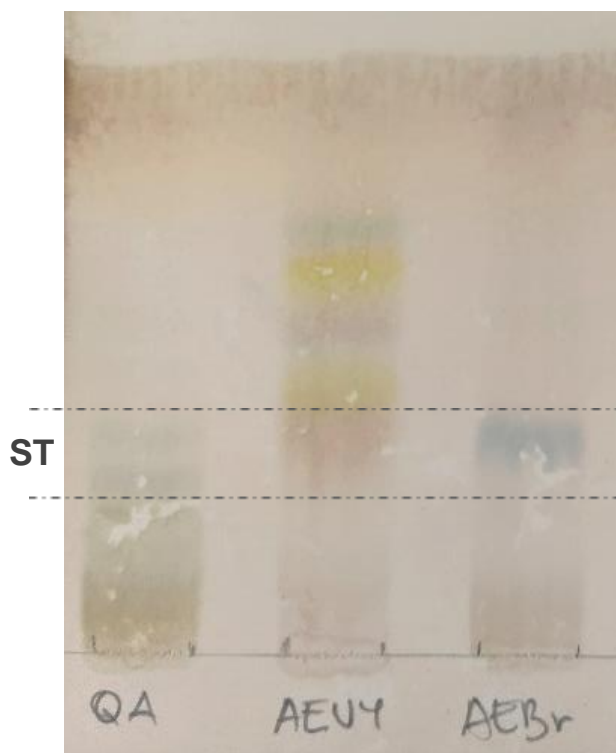


Fig. 5. Cromatografía en capa fina de extractos conteniendo saponinas en solución acuosa. Revelado con MeOH, Ác sulfúrico y anisaldehído (95:4:1). Se observa sembrado de izquierda a derecha: Quil-A®, AEUy y AEBr. El compuesto de interés se encuentra marcado como ST (saponinas triterpénicas).

La presencia de más de una banda en QuilA® denota que ésta mezcla si bien es comercial, continúa siendo una mezcla heterogénea. Según lo observado QuilA® sería incluso más heterogénea que AEBr para la cual se define una única banda correspondiente a ST. Para poder asegurar esto último deben realizarse más ensayos comparativos.

Según la cromatografía obtenida (Fig.5) AEUy es la muestra más heterogénea dadas las bandas amarillas y azul-moradas que presentan mayor migración a ST, ausentes para QuilA® y AEBr. Las bandas de color amarillo indican la presencia de compuestos fenólicos en el extracto obtenido(57).

Las múltiples bandas observadas en AEUy son esperables dado que éste no pasa por procesos de purificación posteriores a su obtención y por lo tanto la muestra tenderá a contener compuestos diferentes.

Por otro lado, sería coherente que AEUy y AEBr provenientes de la misma especie y obtenidos utilizando el mismo protocolo, tuvieran mayor similitud entre ellas que con el control comercial QuilA®. Sin embargo, el patrón de bandas generado por las muestras denota mayor similitud entre AEBr y QuilA® que entre AEBr y AEUy. La causa de este resultado podría estar relacionada con la materia prima empleada para la producción de cada una de las muestras, discusión que será retomada más adelante en el texto.

1.2 MALDI-TOF

Las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas técnica MALDI-TOF. En la Figura 6 se observan los patrones espectrales de AEBr (A), QuilA® (B) y AEUy (C) obtenidos por la Dr. Norma Suárez para este trabajo.

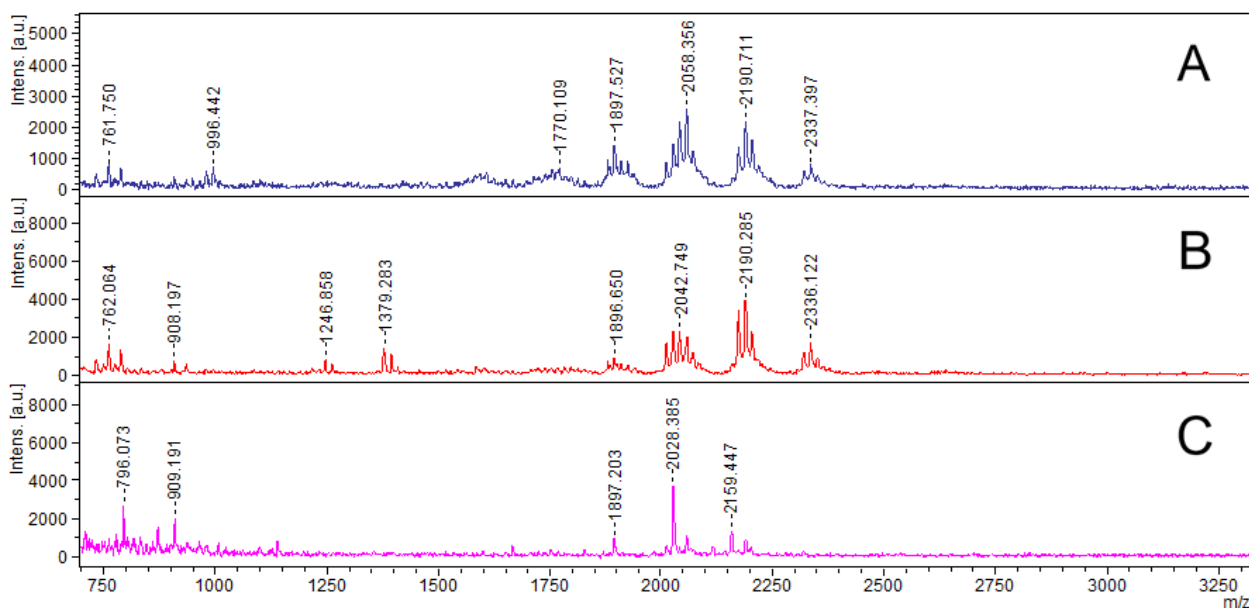


Fig. 6. Espectrometría de masas mediante MALDI-TOF. Se observan los patrones espectrales de AEBr (A), QuilA® (B) y AEUy (C). En los patrones se diferencian dos regiones bien definidas (m/z 750-1000 y 1850-2250) cuyos picos son característicos de saponinas del género *Quillaja*. Los productos fueron detectados como iones $[M+Na]^+$ y/o $[M+K]^+$.

Las tres muestras exponen una relación masa/carga (m/z) similar observándose picos coincidentes en dos regiones del espectro: m/z 750-1000 y 1850-2250. Estas regiones fueron reportadas anteriormente como características de

saponinas del género *Quillaja*(46). Los picos presentes en la menor de estas regiones (m/z 750-1000) son asociados con sustituyentes clivados del núcleo lipofílico (aglicona) de las saponinas(58).

Si bien existe gran similitud en la región m/z 750-1000 para las tres muestras, se observa sobre todo en AEUy, mayor cantidad de picos homogéneos. Esto se vincula con diferentes compuestos presentes en la muestra; siendo coherente con el resultado mostrado para TLC de AEUy donde se observaron múltiples bandas no esperadas que podrían estar relacionadas con mayor presencia de impurezas respecto a AEBr y QuilA®.

El patrón espectral obtenido para las tres muestras en m/z 1850-2250 es esperable según estudios realizados para saponinas del género *Quillaja*(46,58–60). En este caso en el espectro de AEBr y QuilA® se observa además una serie de picos cercanos a m/z 2337 que no se observan para AEUy. Según la publicación de Cibulski S., et al., 2017, el enriquecimiento de mayor cantidad de picos definidos podría relacionarse con una muestra más purificada. Esto tiene sentido para Quil-A® y si bien no es lo esperado para AEBr, es coherente con el resultado obtenido de TLC para esta muestra.

Tanto en el patrón de bandas obtenidas por TLC como en el espectro obtenido por MALDI-TOF se observan algunas diferencias no esperadas entre AEUy y AEBr. A partir de estos resultados para los dos ensayos se concluye que AEUy es más heterogéneo que AEBr. Si bien los extractos fueron obtenidos empleando el mismo protocolo y no pasaron por procesos de purificación posteriores, diferencias en la materia prima utilizada podría dar cuenta de lo observado. Las hojas fueron extraídas de individuos diferentes, expuestos a condiciones no controladas, y por ello pueden presentar variación química; la producción de metabolitos secundarios como las saponinas, depende en gran medida de las condiciones de vida del individuo(18,21). Si bien lo anterior podría ser la explicación más plausible y de mayor peso para las diferencias observadas, no se descarta que exista variación producida por los diferentes operadores involucrados.

Los métodos de análisis empleados para extractos ricos en saponinas (TLC y MALDI-TOF) revelan resultados robustos y complementarios siendo una estrategia costo-efectiva que permite analizar no solo extractos con varios orígenes, sino también lotes de producción diferentes. Esto contribuye a lograr un proceso de producción reproducible(46) y disminuye la incertidumbre de resultados obtenidos a partir de estos extractos al poder confirmar la similitud química entre ellos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por estos métodos en la presente tesis se verifica que la composición de AEUy, AEBr y Quil-A[®] es muy similar, aunque AEUy posee un mayor grado de impurezas. Estos datos apoyan además las similitudes reportadas en otros trabajos entre las saponinas presentes en las dos especies de *Quillaja* (*Q. saponaria* y *Q. brasiliensis*)(46,50).

2. Formulación y análisis de nanopartículas

2.1 Formulación de nanopartículas

Diferentes soluciones conteniendo saponinas (AEUy, AEBr, Quil-A[®]) fueron combinados con colesterol, fosfatidilcolina y el antígeno OVA para producir formulaciones micelares tipo ISCOM o IMX por el método de diálisis(54).

Se produjeron seis formulaciones micelares en dos instancias (Tabla 1).

En una primera instancia se formularon ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy; empleadas como adyuvante en los experimentos con animales. Las formulaciones se analizaron posteriormente mediante MET e IMX-AEUy se analizó además mediante DLS.

En una segunda instancia, se optimizó la concentración de AE en la formulación de IMX-AEUy produciendo IMX-AEUy25 y se formularon además IMX-QuilA[®] como control e IMX-AEBr como punto de comparación de nanopartículas generadas con extractos acuosos obtenidos en diferentes laboratorios. Todas las formulaciones de esta segunda instancia fueron analizadas por MET y DLS para caracterizar los complejos formados.

2.2 Microscopía electrónica de transmisión

Las nanoformulaciones fueron visualizadas mediante MET por la Dra. Gabriela Casanova de la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión (UMET) de Facultad de Ciencias, Udelar, y los resultados se muestran en la Figura 7.

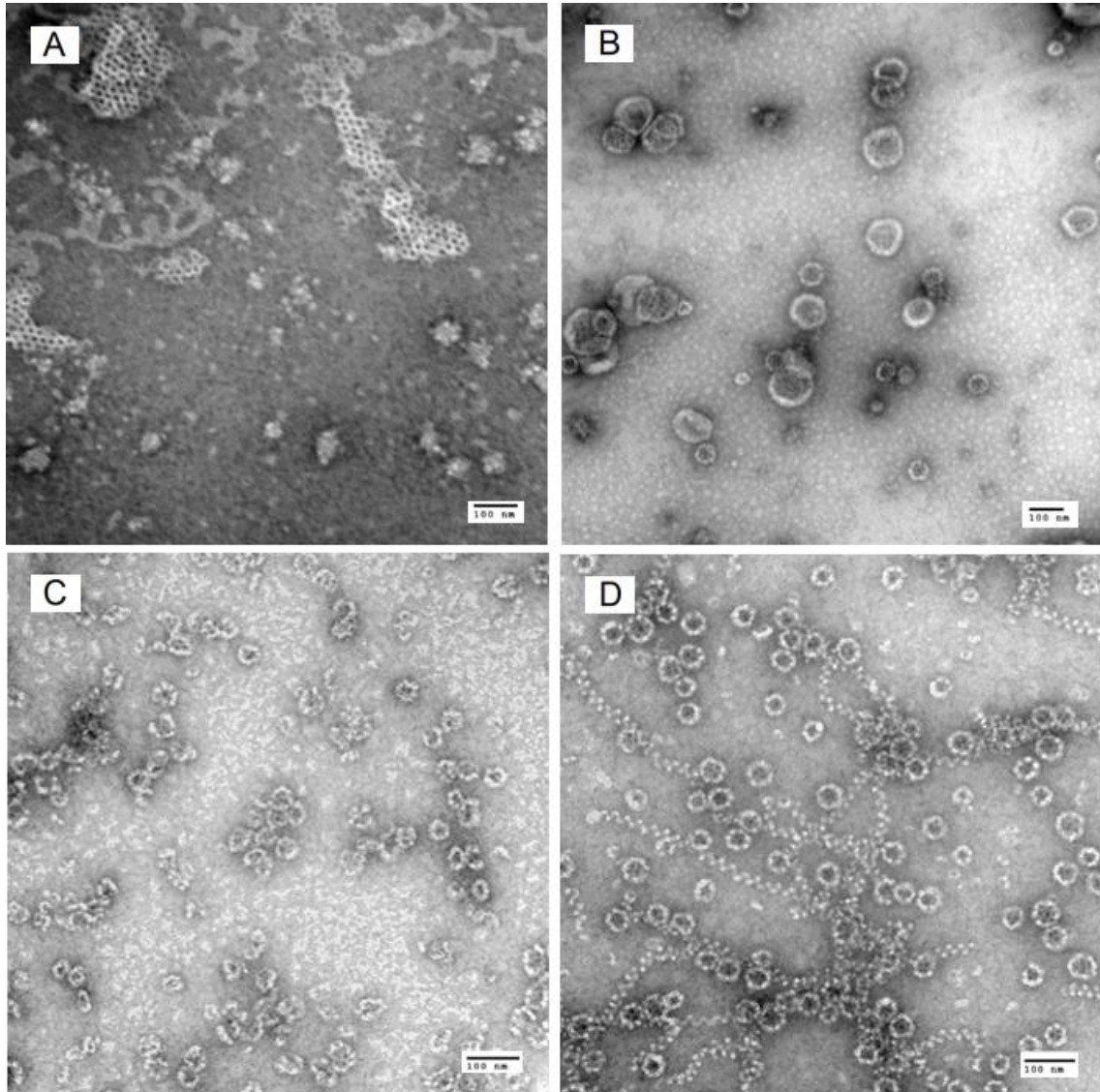


Fig. 7. Microscopía electrónica de transmisión de nanoformulaciones. Las nanoformulaciones fueron producidas a partir de la mezcla de saponinas:colesterol:fosfatidilcolina mediante la técnica de diálisis y fueron visualizadas usando tinción negativa con acetato de uranilo 2% y 80 kV de voltaje. Las imágenes corresponden a: IMX-AEUy 3:1:1 Mag= 100000x (A); IMX-AEUy25 5:1:1 Mag= 80000x (B); IMX-AEBr 3:1:1 Mag= 120000x (C); IMX-Quil-A[®] 3:1:1 Mag= 120000x (D).

En la MET de ISCOM-AEUy e ISCOM-AEBr no se observó la formación de ningún complejo/estructura (imágenes no mostradas).

En la nanoformulación IMX-AEUy se observaron mediante MET (Fig. 7A) pocos complejos esféricos de entre 60 y 80 nm; mayoritariamente se muestran formaciones similares a una malla extendida de tamaños muy superiores y variables cuya estructura interna es similar a la de las nanopartículas esperadas. Dada la baja formación de nanopartículas y la heterogeneidad de IMX-AEUy, se procedió a optimizar la formulación aumentando la concentración de AE produciéndose IMX-AEUy25.

En la micrografía de IMX-AEUy25 (Fig. 7B) se observó gran cantidad de nanopartículas de tamaños variables mayoritariamente superiores al esperado. La forma de estas nanopartículas evidenciadas se asemeja a la estructura esférica tipo caja típica de los complejos buscados y no a la “malla extendida” vista en IMX-AEUy.

Por otro lado, en las imágenes de MET para IMX-AEBr (Fig. 7C) se observaron nanopartículas con aspecto deshidratado, aunque tamaño similar al esperado, rodeadas de segmentos incompletos de ellas en toda la muestra. No se detectaron otros cuerpos a destacar en los campos recorridos con el MET.

Por último, en la formulación IMX-QuilA[®] (Fig. 7D) se observan nanopartículas representativas tanto en forma como en tamaño de IMX, éstas se vieron acompañadas de otros pequeños cuerpos similares a espirales que han sido reportados anteriormente para estas formulaciones micelares(61). En los campos recorridos con el microscopio en esta formulación se percibe además mayor homogeneidad en la muestra que para IMX-AEUy25 lo que deberá ser confirmado mediante DLS.

IMX-AEUy25 se obtuvo empleando la relación AE:colesterol:fosfatidilcolina 5:1:1 viéndose así aumentada la concentración de AE respecto a la relación 3:1:1 evaluada anteriormente (IMX-AEUy). Según nuestro análisis, las saponinas en el AE estarían menos concentradas que otras fracciones evaluadas por nuestro

grupo, por no pasar por procesos de purificación(28). Una menor concentración de saponinas podría influir negativamente en la formación de complejos tipo IMX. La obtención de NPs con tamaño y forma más cercano al esperado a partir del incremento de la concentración de AEUy en la formulación (IMX-AEUy25), indica que este extracto posee menor concentración de saponinas que AEBr y QuilA®. Esto es coherente con el ensayo de TLC para los extractos que sugiere esta diferencia de concentración de saponinas entre las muestras. Es por lo tanto necesaria una mayor cantidad de AEUy en la formulación para lograr la formación de las NPs buscadas.

La variación en la concentración de saponinas en los extractos podría ser consecuencia también del origen de la materia prima por lo mencionado para ensayos anteriores respecto a las saponinas como metabolitos secundarios(18,21). Para confirmar con exactitud esta hipótesis es necesario emplear métodos de cuantificación y caracterización química de saponinas para los extractos, así como también de determinación de impurezas en los mismos.

En concordancia con lo anterior, las características morfológicas (tamaño, forma y estructura interna) de la formulación IMX-QuilA® fue la más cercana a lo esperado y similar a las NPs modeladas que se muestran en la Figura 2. Esto es coherente dado que se empleó para su formulación saponinas comerciales, que son obtenidas a partir de procesos industriales estandarizados(32). Las preparaciones IMX-AEBr y sobre todo IMX-AEUy muestran diferencias en la microscopía respecto al modelo mencionado, verificando la importancia del extracto usado en la formación de complejos tipo IMX.

2.3 Dispersión de la luz dinámica

Las formulaciones de trabajo se analizaron por el método de dispersión de la luz dinámica que muestra la distribución del tamaño (diámetro hidrodinámico) de las principales poblaciones de partículas presentes en una muestra. Los resultados de DLS (Fig. 8) fueron obtenidos por la Dra. Iris Miraballes (Instituto Polo Tecnológico de Pando, IPTP).

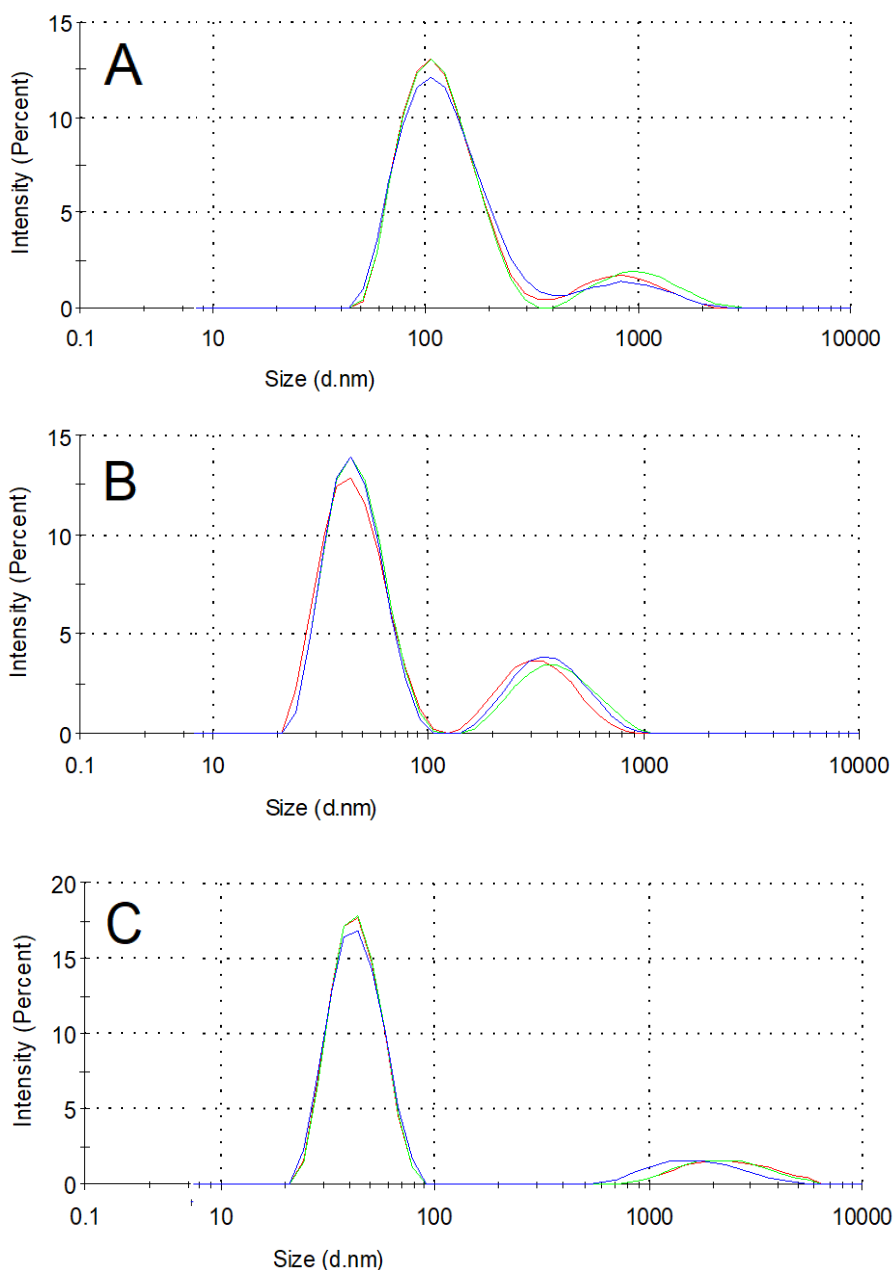


Fig. 8. Dispersión de la luz dinámica de nanoformulaciones Las nanoformulaciones fueron producidas a partir de saponinas:colesterol:fosfatidilcolina mediante el método de diálisis. Se muestra el tamaño de las poblaciones mayoritarias de partículas presentes en las muestras. Tanto para IMX-AEUy25 (A), IMX-QuilA (B) como para IMX-AEBr (C) parte del pico observado corresponde al tamaño esperado para ISCOM-matrix (aproximadamente 40 nm).

Los datos de DLS para IMX-AEUy25 (Fig. 8A) muestran dos poblaciones diferenciadas de partículas. Una población de menor diámetro (45-400 nm) que representa el 88% del total y una segunda población constituida por partículas de entre 400-2000 nm que ocupa solamente un 12% del total de nanopartículas.

El análisis de datos posterior mostró que solo el 25% de las partículas presentes en la muestra poseen un tamaño de 45-100 nm, cercano al esperado de 40nm para nanopartículas tipo ISCOM(30).

Para IMX-QuilA[®] se determinó a partir de los resultados de DLS (Fig. 8B) que el 75% de las nanopartículas presentes en la muestra poseen un diámetro entre 20 y 100 nm y el 25% restante entre 150 y 900 nm. Por tanto, la mayoría de las partículas de esta formulación poseen un tamaño cercano al esperado.

Por último, los resultados para IMX-AEBr (Fig. 8C) mostraron gran cantidad de nanopartículas (86%) con tamaños de entre 20 y 100 nm y una pequeña población (13%) de entre 600 y 6000 nm.

Si bien los resultados anteriores muestran dos poblaciones de NPs en todas las muestras, existen diferencias entre las formulaciones que concuerdan con las halladas anteriormente en el análisis de los extractos con las que fueron formuladas.

La formulación IMX-AEBr es la más similar a IMX-QuilA[®] siendo la población mayoritaria de tamaño cercano al esperado (20-100 nm) en ambas. Además, esta población se ve representada de forma similar en las dos formulaciones (75% en IMX-QuilA[®]; 86% en IMX-AEBr).

En cuanto a la población de NPs de mayor diámetro (que es la menos representada), IMX-QuilA[®] posee 12% más partículas en ella que IMX-AEBr. Sin embargo, el tamaño medio de las partículas de esta población es para IMX-QuilA[®] de 382 nm, mientras que para IMX-AEBr es de 2246 nm. Por otro lado, el pico correspondiente a las partículas de mayor diámetro es más angosto para IMX-QuilA[®], lo que da cuenta de que los tamaños dentro de la misma son más uniformes que para IMX-AEBr (Fig. 8 A y B).

En suma, las poblaciones de NPs en las formulaciones IMX-QuilA[®] e IMX-AEBr son similares, aunque IMX-QuilA[®] es levemente más homogénea que IMX-AEBr.

Las mayores diferencias halladas se observan en IMX-AEUy25 en la cual solo un 25% de las partículas poseen un tamaño entre 40 y 100 nm y las NPs

restantes se ven distribuidas hasta los 2000 nm de diámetro aproximadamente. Dadas estas características, IMX-AEUy25 resulta la formulación más heterogénea y con menor efectividad para la formación de las NPs buscadas. Esto tiene sentido a la luz del análisis de extractos descrito en el que se destaca AEUy como la muestra más heterogénea y con mayores diferencias respecto a AEBr y QuilA[®]. Como se mencionó previamente, se considera que la homogeneidad del extracto acuoso empleado, así como también la cantidad de las saponinas en éste podrían ser características relevantes para la formación de nanopartículas tipo IMX.

3. Análisis de toxicidad in vitro: hemólisis

Según lo mencionado en la introducción del presente trabajo, debido a sus características fisicoquímicas las saponinas causan lisis en células animales, entre ellas en los glóbulos rojos. En este sentido, se determinó la capacidad hemolítica de los diferentes AEs (AEUy y AEBr) y saponinas comerciales (QuilA[®]) así como también de las formulaciones nanoparticuladas (ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy) utilizadas en este trabajo.

La Figura 9 muestra la actividad hemolítica en función de la concentración de los candidatos a adyuvante. Los resultados se expresan en porcentaje de hemólisis, considerando la hemólisis causada por QuilA[®] 250 µg/mL y PBS como 100 y 0% de hemólisis respectivamente.

Para comparar la actividad hemolítica de las diferentes muestras se toma el valor de la concentración a la que las formulaciones fueron capaces de hemolizar al 50% de glóbulos rojos (HD₅₀, del inglés *haemolysis dose 50*) obteniéndose los siguientes resultados: el HD₅₀ para AEUy fue de 1773,63 µg/mL mientras que para AEBr resultó de 52,85 µg/mL y para QuilA[®] de 71,56 µg/mL. Las nanoformulaciones (ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy) no presentaron hemólisis en el rango de concentración ensayadas (Fig. 9).

Según se observa, AEBr es el más hemolítico de los adyuvantes evaluados (HD₅₀= 52,85 µg/mL) seguido por QuilA[®] (HD₅₀= 71,56 µg/mL), AEUy (HD₅₀=

1773,63 $\mu\text{g/mL}$) y por último ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy, que no produjeron efecto hemolítico en el rango de concentraciones ensayadas.

De esta manera se demuestra que efectivamente las saponinas de AEBr y QuilA[®] incluidas en complejos formados por colesterol, fosfatidilcolina y OVA pierden su capacidad hemolítica. Para el caso de AEUy, se deben testar concentraciones de IMX-AEUy mayores a las ensayadas dado que el extracto no presenta hemólisis a 500 $\mu\text{g/mL}$ y por lo tanto, no se observa la diferencia buscada.

A partir de las evidencias anteriores, podemos proponer que las saponinas combinadas con Chol y Pc y en algunos casos OVA son mejores candidatas a adyuvante por verse disminuida su toxicidad(25,55). Sin embargo, este ensayo no determina si los complejos formados son de tipo ISCOM. Al ser estudiados mediante MET no se observa la formación de las estructuras esperadas para ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr ni IMX-AEUy (Fig. 7).

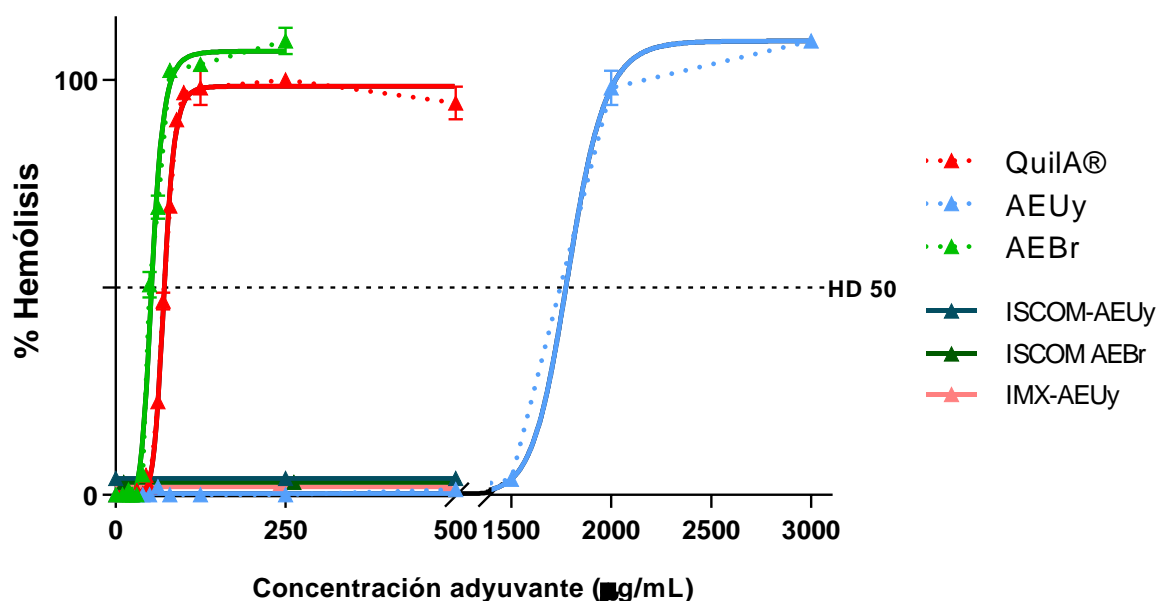


Fig. 9. Ensayo de toxicidad *in vitro*. Actividad hemolítica de QuilA[®], AEUy, AEBr, ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy. La hemólisis se expresa como porcentaje de glóbulos rojos hemolizados considerando PBS y Quil-A[®] 250 $\mu\text{g/mL}$ como 0 y 100% de hemólisis respectivamente. Los resultados se presentan como la media \pm SEM (n= 4).

Analizando más en detalle el comportamiento hemolítico de las diferentes muestras, si bien no era esperable encontrar diferencias significativas entre AEUy y AEBr (por ser obtenidos mediante el mismo proceso) éstos presentan

diferencias notorias siendo el segundo treinta veces más hemolítico que el primero.

Los resultados del ensayo de hemólisis son coherentes con los obtenidos mediante TLC, MALDI-TOF y los análisis de las nanopartículas formadas por éstos en los que se observó mayor similitud entre Quil-A® y AEBr que entre los dos AEs y además se notó que la concentración de saponinas de AEBr podría ser superior que en las demás muestras, dada la intensidad de color en la TLC (Fig. 5) lo que es coincidente con un efecto hemolítico superior.

4. Ensayo de vacunación

Para evaluar y comparar la respuesta inmune celular y humoral desencadenada por los candidatos a adyuvante se realizó un ensayo de vacunación en modelo murino.

Los animales (ratones hembra cepa CD1) usados para el ensayo tenían ocho semanas de edad con un peso de 31 ± 4 g. Éstos fueron inmunizados con dos dosis de 0,1 mL de la formulación vacunal correspondiente según el grupo (Tabla 3). Las dosis se inocularon los días 0 y 14 por vía subcutánea.

Si bien fueron realizados ensayos de toxicidad *in vitro*, es imprescindible realizar ensayos de toxicidad *in vivo* para determinar la dosis de los candidatos a adyuvante a ser testada. Los ensayos *in vivo* brindan información relevante para evaluar la vacuna desde el punto de vista de su toxicidad en el animal.

Dada la existencia de resultados comparables reportados previamente por nuestro grupo, no se realizaron tales ensayos de toxicidad *in vivo* por razones éticas del uso de animales de experimentación. A partir de los resultados ya existentes(28,46), se determinó la concentración empleada en las formulaciones vacunales de la presente tesis.

5. Respuesta inmune

5.1 Respuesta celular: DTH

Con el fin de evidenciar la inmunidad celular antígeno específica se realizó un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH).

Al día 28 post priming se inoculó 1 µg de OVA en 10 µL de PBS en la almohadilla plantar izquierda de los animales. Se midió el espesor de las patas de los animales 24 h post inoculación del antígeno.

Ensayos previos del grupo utilizando QuilA[®], fracciones purificadas de AEBR (QB80 y QB90) y sus respectivas nanopartículas como candidatos a adyuvante y antígeno BVDV u OVA como antígenos, mostraron diferencias en la inflamación producida en el ensayo de DTH entre ratones inmunizados con vacunas adyuvadas con nanopartículas o con extracto acuoso y animales inmunizados con vacunas sin adyuvante(28,53).

Los resultados obtenidos en el ensayo de DTH del presente trabajo se presentan en la Figura 10.

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn, y se compararon todos los grupos normalizados respecto a la media del grupo PBS contra el grupo control sin adyuvante (OVA) igualmente normalizado. Además, se compararon los datos crudos de todos los grupos contra grupo PBS. Se consideran en ambos casos diferencias significativas si $p < 0,05$.

El grupo PBS no tuvo contacto con el antígeno previo ni durante este ensayo. Por lo tanto, la inflamación observada en los ratones se debe a la respuesta inmune producida por el efecto del pinchazo.

La diferencia observada entre el valor promedio del grupo PBS respecto a los demás grupos correspondería a la respuesta específica frente al antígeno y no a la inflamación inespecífica producida generalmente por DAMPs inherentes al procedimiento de inoculación.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos con adyuvante y el grupo que recibió sólo el antígeno (OVA) al normalizar los resultados respecto al grupo PBS (Fig. 10A). Tampoco se observaron diferencias al analizar los datos crudos de cada grupo respecto al grupo control PBS (Fig. 10B).

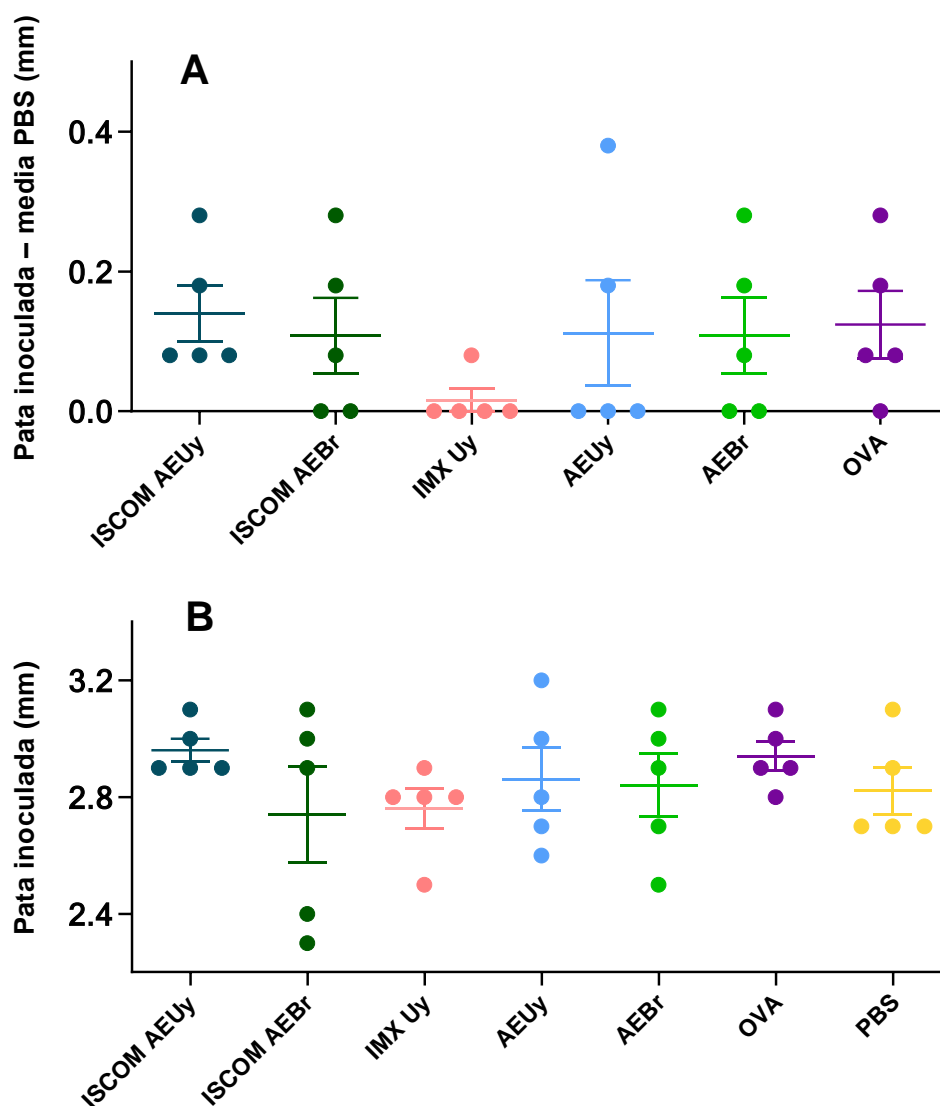


Fig. 10. Ensayo de hipersensibilidad retardada. Se muestra el espesor de las patas post 24 hs de inoculación intradérmica con OVA de los diferentes grupos de ratones (n=5) al día 28 del ensayo de vacunación. Se muestran los resultados normalizados frente a la media del grupo PBS (A) y los resultados crudos (sin normalizar) (B). Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn, para comparar todos los grupos respecto al grupo control sin adyuvante (OVA) (A) y al grupo control PBS (B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Se esperaba que el grupo OVA (inmunizado solo con el antígeno) mostrara diferencias respecto al grupo PBS, dado que una de las características de este antígeno modelo es ser inmunogénico. La inmunogenicidad de OVA fue además evidenciada en ensayos publicados en los que se usan saponinas de *Q. brasiliensis* como adyuvante(28). Sería coherente entonces, que todos los grupos cuya formulación vacunal contenga el antígeno (Tabla 3) mostraran una reacción de DTH aumentada respecto al grupo PBS. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en este sentido (Fig.10).

5.2 Análisis de la respuesta inmune humoral: titulación de anticuerpos mediante ELISA

Con el fin de evaluar la respuesta humoral generada por las distintas formulaciones vacunales se realizó un ensayo de ELISA(28). Se titularon los anticuerpos IgGtotal (IgG_{Tot}) específicos anti-OVA en los sueros de los animales a los días 0, 14 y 28 del ensayo de vacunación descrito anteriormente (Fig. 4).

El título de anticuerpos se expresó en unidades arbitrarias (UA). Se definió 1 UA como el equivalente a la absorbancia de la dilución 1/1000 del pool de sueros utilizados para la curva de calibración.

Para el análisis estadístico de datos se comparó cada grupo contra el grupo PBS aplicando el test de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn. Para evaluar las diferencias entre los títulos de anticuerpos IgG_{Tot} obtenidos a los distintos tiempos (días 0, 14 y 28) dentro de cada grupo, se realizó el test estadístico Mann-Whitney. Se consideran diferencias estadísticamente significativas si * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados de las titulaciones se muestran en la Figura 11.

No se observan diferencias significativas entre el grupo control (PBS) y el grupo sin adyuvante (OVA) para ninguno de los días evaluados.

Al igual que para el ensayo de DTH, era esperable observar diferencias significativas en la respuesta humoral anti-OVA entre todos los grupos con

antígeno y el grupo PBS. Además, dado el efecto conocido de los candidatos a adyuvante como tales, también se esperaba hallar diferencias entre el grupo OVA (con antígeno, sin adyuvante) y los grupos con formulación vacunal adyuvada.

14 días después del priming, solo el grupo AEBr ($p < 0,001$) muestra diferencias significativas en el título de anticuerpos respecto al grupo PBS (Fig. 11A). Por otro lado, al día 28 se observan diferencias estadísticamente significativas en los títulos de IgG_{Tot} para el grupo IMX-AEUy ($p < 0,05$) y para el grupo AEBr ($p < 0,001$) respecto al grupo PBS (Fig. 11B).

La diferencia hallada en el grupo IMX-AEUy tiene sentido dada la formación de complejos demostrada por MET y DLS para esta formulación. El aumento en los títulos de anticuerpos en el grupo AEBr es coherente con resultados anteriores dónde, el extracto empleado como adyuvante en este grupo (AEBr) posee mayor concentración de saponinas en relación a los demás extractos evaluados.

Al analizar los resultados de cada grupo en particular, se observan diferencias en el título de anticuerpos IgG_{Tot} anti-OVA entre el día 0 y el día 14 solo para AEBr ($p < 0,01$, datos no mostrados). Sin embargo, entre el día 14 y el día 28 post *priming* todos los grupos con formulaciones conteniendo OVA presentan diferencias en los títulos de IgG_{Tot} anti-OVA (Fig. 11B asteriscos coloreados).

Lo anterior evidencia la generación de respuesta humoral específica frente al antígeno 14 días después del *booster*. La ausencia de diferencias en el título de anticuerpos entre el día 0 y el día 14 post *priming* de la mayoría de los grupos a excepción de AEBr, indica que sólo el adyuvante que presentó mayor toxicidad (AEBr) fue capaz de generar una respuesta humoral específica luego de la primera inmunización. Si bien es coherente que el adyuvante más tóxico potencie en mayor medida la respuesta, se esperaba que todos los grupos presentaran diferencias en el título de anticuerpos IgG_{Tot} entre el día 0 y el día 14 dadas las características inmunogénicas del antígeno modélico empleado(28).

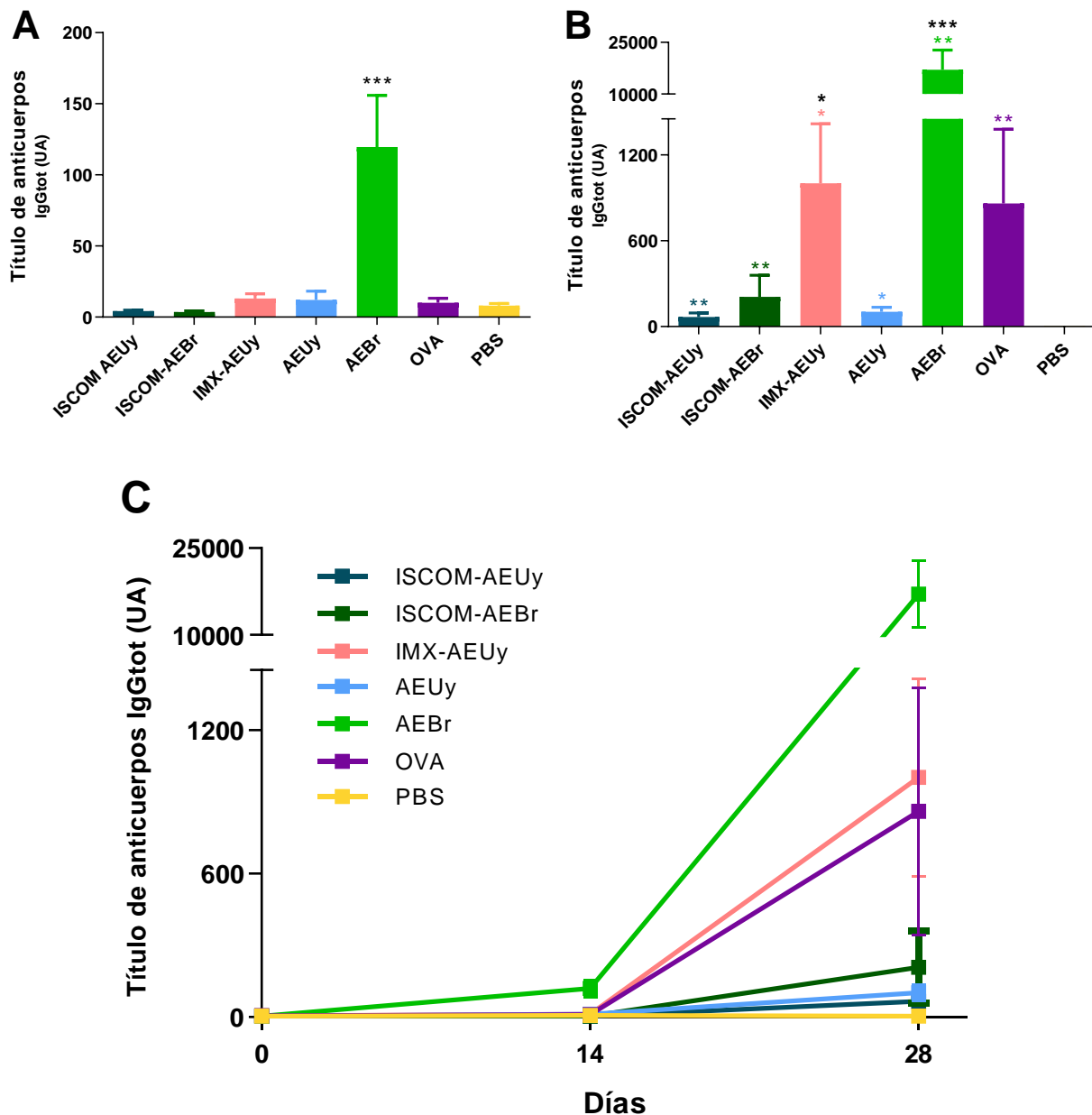


Fig. 11. Titulación de anticuerpos séricos IgG total anti-OVA. El ensayo de vacunación se realizó en modelo murino, los ratones se inocularon por vía subcutánea en la zona interescapular con distintas formulaciones conteniendo OVA y AEs de *Q. brasiliensis* o sus nanopartículas como adyuvantes. Los ratones se inocularon a los días 0 y 14. Se muestran los títulos de anticuerpos IgG_{tot} anti-OVA en suero al día 14 (A), al día 28 (B) y la cinética a lo largo de todo el ensayo (C). Se presentan los resultados como la media \pm SEM (n=5) en UA para cada grupo. Se compararon los títulos de cada día respecto al grupo PBS aplicando el test estadístico de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. Además, se analizaron las diferencias dentro de cada grupo entre los distintos días aplicando el test estadístico Mann-Whitney. Se consideran diferencias significativas si $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$. Las diferencias respecto al grupo PBS se muestran con asteriscos negros. Las diferencias dentro de cada grupo del día 28 respecto al día 14 se muestran en asteriscos coloreados.

Conclusiones

La vacunación es una de las mejores estrategias para la prevención y el control de múltiples enfermedades infecciosas. Una estrategia para mejorar la respuesta inmune que éstas generan, es la adición de adyuvantes(2,3). La generación de ISCOM-MATRIX producidos directamente con AE de *Q. brasiliensis*, como adyuvante posibilitaría la generación de una plataforma amplia de bajo costo y menor daño ambiental para la formulación de vacunas con diferentes antígenos, con posibles aplicaciones en la industria veterinaria(11,27,49).

En este trabajo se produjo exitosamente extracto acuoso a partir de las hojas de *Quillaja brasiliensis* con un rendimiento del 15,3%.

Si bien la generación de espuma durante la obtención de AE reveló de forma anticipada la presencia de saponinas en el producto, ésta se verificó mediante TLC y MALDI-TOF.

Comparando el patrón de bandas de AEUy obtenido en el ensayo de TLC con estudios anteriores(50,57) y con los patrones de AEBr y QuilA[®] sembrados, se concluye que los tres extractos empleados en este trabajo (AEUy, AEBr y QuilA[®]) contienen saponinas triterpénicas. Además, la mayor intensidad de la banda presente en AEBr, da la idea de mayor presencia de saponinas triterpénicas en la mezcla.

Por otro lado, los picos obtenidos por MALDI-TOF en las regiones m/z 750-1000 y 1850-2250 son característicos para saponinas del género *Quillaja*(46,58–60), confirmando lo evidenciado por TLC.

Respecto a los AEs analizados se concluye que, si bien los tres extractos poseen gran identidad entre ellos, AEBr y QuilA[®] son las mezclas que presentan mayor similitud tanto por su patrón de bandas (TLC) como por su análisis espectral de escisión (MALDI-TOF). Esta similitud entre saponinas de *Q. brasiliensis* y *Q. saponaria*, es concordante con estudios previos(46). No obstante, se esperaba que los extractos obtenidos a partir de la misma especie (AEUy y AEBr) tuvieran mayor similitud entre sí que con el extracto de *Q. saponaria* (QuilA[®]).

Por otro lado, AEUy resultó ser el extracto más heterogéneo en comparación con AEBr y QuilA[®]. Según lo observado en los ensayos de TLC y MALDI-TOF, se

infiere que AEUy presenta mayor diversidad de compuestos (impurezas) que no corresponden a saponinas triterpénicas. La cromatografía en capa fina de AEUy mostró mayor cantidad de bandas y un patrón espectral de escisión (por MALDI-TOF) con mayor cantidad de picos homogéneos (principalmente en m/z 750-1000) que AEBr y QuilA[®]. Además, según se ha reportado previamente, la presencia de picos definidos observados para AEBr y QuilA[®] en m/z 1850-2250 da cuenta de extractos más puros(46).

Si bien la cromatografía en capa fina brinda información general no cuantitativa de las muestras, su bajo costo y accesibilidad la hacen una técnica óptima para obtener con rapidez un primer acercamiento global de la composición del extracto producido. TLC y MALDI-TOF son herramientas complementarias y costo-efectivas con gran potencial a ser explorado para el análisis de extractos, pudiendo contribuir en la caracterización de saponinas para asegurar la reproducibilidad buscada en su producción.

Es probable que las diferencias halladas en los AEs tengan origen en las materias primas empleadas para la producción de éstos. Los procesos metabólicos secundarios que llevan a la producción de compuestos tales como las saponinas, son determinados por diversos factores tales como el *background* genético, el tipo de tejido, la edad, el estado fisiológico del vegetal, el clima, los cambios de estación, la temperatura, humedad, la fertilidad del suelo y las técnicas de cultivo entre otros. Esto lleva a que los AEs extraídos tengan diferencias tanto cualitativas como cuantitativas(18,21). Los tres AEs comparados en el presente trabajo (AEUy, AEBr y QuilA[®]), si bien son similares en algunos aspectos analizados, tienen origen en zonas geográficas diferentes lo que hace que la mayoría de los factores mencionados puedan estar incidiendo en su composición.

Es claro entonces que, para utilizar AEs en vacunas para la industria veterinaria, lo más adecuado es extraer la materia prima de árboles de producción homogénea controlando al máximo factores físicos, biológicos y ecosistémicos para obtener mayor reproducibilidad en el producto(62).

En la presente tesis de grado fueron formuladas también de forma exitosa NPs tipo ISCOM e IMX a partir de AEUy, AEBr y QuilA[®].

Si bien en la primera instancia la formulación IMX-AEUy se observó mediante MET como una malla extendida, al repetir el proceso y aumentar la concentración de AEUy (IMX-AEUy25), se produjeron NPs similares a las esperadas, aunque con tamaños promedio mayores (evidenciados por MET y DLS). Sólo un 25% de las NPs de IMX-AEUy25 alcanzaron un tamaño cercano al descrito para IMX(31,32). La mejora en la formación de NPs al aumentar la concentración de AEUy revela que es probable que este extracto posea menor concentración de saponinas que AEBr y QuilA[®] y que por lo tanto en la primera instancia de formulación no se alcanzara la relación suficiente de saponinas:Chol:Pc para la formación de los complejos inmunoestimulantes.

La generación de un método para la cuantificación absoluta de saponinas en solución sería una importante herramienta que permitiría optimizar la formulación de NPs de forma ágil y metódica. Además, la cuantificación contribuiría a profundizar la caracterización de diferentes extractos.

Respecto a la formación de NPs, en IMX-AEBr e IMX-QuilA[®] se lograron mejores resultados, alcanzándose un 86% y 75% respectivamente de NPs de entre 20 y 100 nm. Por otro lado, estas formulaciones muestran similitudes evidenciadas por MET y DLS lo que es coherente con los resultados para los extractos que las componen (AEBr y QuilA[®] respectivamente) cuyo análisis por MALDI-TOF y TLC también mostró mayor similitud que con AEUy. A partir de lo anterior, se concluye que las tres formulaciones pueden optimizarse para obtener poblaciones más homogéneas de NPs con características deseadas.

Técnicas como MET y DLS resultaron ser complementarias para el análisis y caracterización de NPs formuladas y no pueden ser obviadas en la producción de IMX para uso industrial o experimental.

La aplicación de técnicas de exclusión molecular tales como la centrifugación en gradiente de sacarosa(54) y el método de extrusión(63), sería clave para la homogeneización del tamaño de la población de NPs formuladas, lo que contribuiría a la estandarización del producto.

Además, la optimización de un método de cuantificación de las NPs tipo ISCOM formadas permitiría ajustar la cantidad administrada en cada dosis vacunal de manera precisa. En el Instituto de Higiene existe un equipo denominado zSizer con gran potencial para esta línea de investigación. Dicho equipo, permite cuantificar y medir las NPs de una muestra. Sin embargo, el mismo está en

proceso de instalación por lo que no estaba disponible al realizar los experimentos del presente trabajo.

Respecto a la toxicidad de los diferentes candidatos a adyuvante se concluye que AEBr es el más hemolítico de los adyuvantes evaluados ($HD_{50} = 52,85 \mu\text{g/mL}$) seguido por QuilA[®] ($HD_{50} = 71,56 \mu\text{g/mL}$) y por último AEUy ($HD_{50} = 1773,63 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado, las formulaciones ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy no produjeron efecto hemolítico en las concentraciones ensayadas. De esta manera se verifica que efectivamente que cuando las saponinas son incluidas en complejos inmunoestimulantes formados por colesterol, fosfatidilcolina y en algunos casos OVA (IMX o ISCOMs) pierden su capacidad hemolítica. Estas formulaciones resultan por lo tanto mejores candidatas a adyuvante por presentar menor toxicidad(25,55) y poseer el tamaño óptimo para su internalización y posterior procesamiento y presentación por parte de las APCs(37).

Se identificó además que la ausencia de efecto hemolítico no es un indicador determinante de la formación de complejos inmunoestimulantes tipo ISCOMs. Si bien ISCOM-AEUy, ISCOM-AEBr e IMX-AEUy no presentaron hemólisis, la MET para las dos primeras no mostró la formación de ninguna estructura (imágenes no mostradas) y para IMX-AEUy la MET mostró estructuras tipo malla extendida y no tipo ISCOM (Fig. 7A). A partir de esto se concluye que la visualización de las nanoformulaciones mediante MET y DLS es fundamental para confirmar la formación de las NPs esperadas y realizar estudios posteriores.

Los resultados del ensayo de hemólisis son coherentes con los obtenidos mediante TLC, MALDI-TOF, MET y DLS en los cuales se observó mayor similitud entre Quil-A[®] y AEBr. Éstos fueron los extractos más hemolíticos, coincidiendo con la hipótesis de que AEBr contiene mayor presencia de saponinas respecto a AEUy, tal como fue evidenciado por la gran intensidad de banda en la TLC para AEBr y por la dificultad de formación de NPs por parte de AEUy en la primera instancia de formulación.

Respecto a los resultados de los experimentos con animales, a partir del ensayo de DTH se concluye que la inmunización con OVA no produjo respuesta celular específica detectable mediante esta técnica. No se observaron diferencias entre

los grupos inmunizados con formulaciones vacunales conteniendo OVA (Tabla 3) y el grupo control negativo (PBS).

En el ensayo de ELISA, si bien tampoco se observaron las diferencias esperadas, se observaron únicamente diferencias significativas entre los grupos IMX-AEUy y AEBr en relación con el grupo PBS. Esto indica que IMX-AEUy y AEBr cumplen su rol como adyuvante al potenciar la formulación vacunal, lo que podría estar relacionado con la formación de complejos conteniendo saponinas (para el grupo IMX-AEUy) y con una mayor concentración de saponinas en AEBr en relación a AEUy (para el grupo AEBr). Según se ha reportado previamente, la formación de complejos diferentes a los tipo ISCOMs demostrada para IMX-AEUy mediante MET podría influir tanto en la internalización de las NPs por parte de las APCs como en la llegada de las NPs a los dLNs afectando así la respuesta inmune adaptativa celular y humoral producida(61,64,65). Lo mismo sucede para ISCOM-AEUy e ISCOM-AEBr cuya MET no muestra formación de complejos a pesar de los resultados del ensayo de hemólisis.

Como principales aportes de este trabajo se destaca que tanto la producción exitosa de extracto acuoso a partir de las hojas de *Q. brasiliensis* como de las NPs tipo IMX formuladas con éste, contribuyen a la investigación para el desarrollo de una plataforma adyuvante de bajo costo y menor impacto ambiental que permitirá potenciar vacunas contra diferentes antígenos.

La relevancia en la investigación de una plataforma adyuvante versátil que permita producir vacunas efectivas con rapidez contra, por ejemplo, patógenos intracelulares, quedó demostrada con la actual pandemia causada por SARS-CoV-2. Estas formulaciones nanoparticuladas tipo IMX basadas en saponinas pueden ser almacenadas a 4°C por al menos dos años, y pueden combinarse con diversos antígenos proteicos, lo que representa un insumo interesante para la formulación ágil de vacunas.

El contexto de la pandemia de Covid-19, ha logrado reivindicar, evidenciar y realzar el rol de la ciencia y en particular de la vacunación para la sociedad, lo que es de suma importancia para su desarrollo conjunto.

Perspectivas a futuro.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo será pertinente desarrollar los siguientes puntos para continuar con esta línea.

- Establecer protocolos para la obtención de las hojas de *Q. brasiliensis* (controlando la mayor cantidad de factores) y constatar posteriormente mejorías en la reproducibilidad de resultados.
- Desarrollar un método de cuantificación absoluta de saponinas.
- Implementar el uso del zSizer del Instituto de Higiene para medir y cuantificar las NPs presentes en las nanoformulaciones producidas.
- Optimizar las formulaciones de NPs.
- Poner en práctica técnicas de exclusión molecular tales como la centrifugación en gradiente de sacarosa y el método de extrusión molecular para lograr formulaciones de mayor homogeneidad.
- Previo a los ensayos con animales verificar la formación de nanopartículas tipo IMX mediante MET.
- Repetir el ensayo *in vivo* con previa caracterización de los extractos y las nanopartículas teniendo en cuenta los puntos anteriores.
- Caracterizar la respuesta inmune (celular y humoral) potenciada por NPs tipo IMX en mayor profundidad.
- Una vez que se logren resultados satisfactorios con el antígeno modélico, realizar el ensayo *in vivo* con antígenos de enfermedades infecciosas, evaluar la protección.

Bibliografía.

1. Massarini A, Schnek A. Un enfoque pedagógico situado e indisciplinado. In: Ciencia entre todxs. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Paidós; 2015. p. 102–31.
2. Mcvey S, Jishu S. Vaccines in Veterinary Medicine : A Brief Review of History and Technology. *Vet Clin NA Small Anim Pract* [Internet]. 2010;40(3):381–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.001>
3. Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Meeusen ENT, Walker J, Peters A, et al. Current Status of Veterinary Vaccines. *Clin Microbiol Riviews*. 2007;20(3):489–510.
4. Mutwiri G, Gerdtz V, Lopez M, Babiuk LA. Innate immunity and new adjuvants. *Rev Sci Tech*. 2007;26(1):147–56.
5. L. Dudek N, Perlmutter P, Isabel Aguilar M-, P. Croft N, W. Purcell A. Epitope Discovery and Their Use in Peptide Based Vaccines. *Curr Pharm Des*. 2010;16(28):3149–57.
6. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med*. 2005;11(4S):S25.
7. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol*. 2009;30(1):23–32.
8. Ramon G. Sur L'augmentation anormale de L'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet*. 1925;101:227–234.
9. Lombard M, Pastoret P, Moulin A. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech*. 2007;26(1):29–48.
10. Spickler AR, Roth JA. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. *J Vet Intern Med*. 2003;17:273–81.
11. Montomoli E, Piccirella S, Khadang B, Mennitto E, Camerini R, Rosa A De. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(7):1053–62.
12. Sun H, Xie Y, Ye Y. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009;27:1787–96.

13. Sjo A, Cox JC, Barr IG. ISCOMs : an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol.* 1998;64(December):713–23.
14. Lacaille-Dubois MA. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine.* 2019;60(March):152905.
15. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, et al. Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(24):2320–32.
16. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* [Internet]. 2020;586(7830):516–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
17. Novavax I. NOVAVAX COVID-19 vaccine demonstrates efficacy in UK phase 3 [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 30]. Available from: <https://ir.novavax.com/news-releases/news-release-details/novavax-covid-19-vaccine-demonstrates-893-efficacy-uk-phase-3>
18. Faizal A, Geelen D. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev.* 2013;12:877–93.
19. Costa F De, Yendo ACA, Fleck JD, Gosmann G. Immunoadjuvant and Anti-Inflammatory Plant Saponins : Characteristics and Biotechnological Approaches Towards Sustainable Production. *Mini-Reviews Med Chem.* 2011;11:857–80.
20. Wallace F, Bennadji Z, Ferreira F, Olivaro C. Structural characterisation of new immunoadjuvant saponins from leaves and the first study of saponins from the bark of *Quillaja brasiliensis* by liquid chromatography electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2019;30(6):1–9.
21. Szakiel A, Pączkowski C, Henry M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev.* 2011;10(4):471–91.
22. Sparg SG, Light ME, Staden J Van. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 2004;94:219–43.
23. San Martin R, Briones R. Industrial Uses and Sustainable Supply of. *Econ Bot.* 1999;53(3):302–11.
24. Dalsgaard K. ADJUVANTS. *Vet Immunol Immunopathol.* 1987;17:145–52.
25. De Groot C, Müller-Goymann CC. Saponin Interactions with Model

- Membrane Systems - Langmuir Monolayer Studies, Hemolysis and Formation of ISCOMs. *Planta Med.* 2016;82(18):1496–512.
26. Lorent JH, Quetin-leclercq J, Mingeot-leclercq M. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Org Biomol Chem.* 2014;12:8803–22.
 27. Drane D, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky E. ISCOMATRIX™ adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6(5):761–72.
 28. Paulo S, Mourglia-ettlin G, Fumaco T, Quirici L, Michel P, Ferreira F, et al. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(9):1162–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029>
 29. Sun HX, Xie Y, Ye YP. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine.* 2009;27(33):4388–401.
 30. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature.* 1984;308(5958):457–60.
 31. Lövgren-Bengtsson K, Morein B. The ISCOM™ Technology. *Methods Mol Med.* 2003;42:239–58.
 32. Pedersen JS, Oliveira CLP, Hübschmann HB, Arleth L, Manniche S, Kirkby N, et al. Structure of immune stimulating complex matrices and immune stimulating complexes in suspension determined by small-angle X-ray scattering. *Biophys J.* 2012;102(10):2372–80.
 33. Lövgren Bengtsson K, Morein B, Osterhaus AD. ISCOM technology-based Matrix M™ adjuvant: Success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):401–3.
 34. Mohsen MO, Gomes AC, Cabral-Miranda G, Krueger CC, Leoratti FM, Stein J V., et al. Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. *J Control Release* [Internet]. 2017;251:92–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.031>
 35. Magedans YVS, Yendo ACA, Costa F De, Gosmann G, Arthur G. Foamy

- matters: an update on Quillaja saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Med Chem.* 2019;
36. Paillot R. A systematic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines.* 2014;2(4):797–831.
 37. Morelli AB, Becher D, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E. Review ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J Med Microbiol.* 2012;61:935–43.
 38. den Brok MH, Bull C, Wassink M, Graaf AM De, Wagenaars JA, Minderman M, et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun.* 2016;
 39. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10697–702.
 40. Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, Mitchell S, Barnden M, Moskwa A, et al. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX™ vaccine: A phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin.* 2009;5(3):151–7.
 41. Nicholaou T, Chen W, Davis ID, Jackson HM, Dimopoulos N, Barrow C, et al. Immunoediting and persistence of antigen-specific immunity in patients who have previously been vaccinated with NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX™. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(11):1625–37.
 42. Wilson NS, Yang B, Morelli AB, Koernig S, Yang A, Loeser S, et al. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8 T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2012;90(5):540–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2011.71>
 43. Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:465–74.
 44. Sjölander A, Van 't Land B, Bengtsson KL. Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol.* 1997;177(1):69–76.
 45. Fern K. Imágenes Quillaja Sap.pdf. *The Useful Tropical Plants Database.* 2014.
 46. Cibulski S, Rivera-patron M, Suárez N, Pirez M, Rossi S, Carolina A, et al.

- Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2017;36(1):55–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.030>
47. Luebert F. Taxonomy and distribution of the genus *Quillaja* Molina (*Quillajaceae*). *J Bot Taxon Geobot*. 2014;124(4):157–62.
 48. Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marqués JM, Chabalgoity A, Costa F De, et al. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(49):9177–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.137>
 49. Schlotterbeck T, Castillo–Ruiz M, Cañon–Jones H, Martín RS. The Use of Leaves from Young Trees of *Quillaja saponaria* (Molina) Plantations as a New Source of Saponins. *Econ Bot*. 2015;69(3):262–72.
 50. Yendo AC, De Costa F, Kauffmann C, Fleck JD, Gosmann G, Fett-neto AG. Purification of an Immunoadjuvant Saponin Fraction from *Quillaja brasiliensis* Leaves by Reversed-Phase Silica Gel Chromatography. In: *The Vaccine Book: Second Edition*. 2016. p. 67–76.
 51. Wallace F, Bennadji Z, Ferreira F, Olivaro C. Analysis of an immunoadjuvant saponin fraction from *Quillaja brasiliensis* leaves by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Phytochem Lett* [Internet]. 2017;20(April):228–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.020>
 52. Yendo ACA, de Costa F, Cibulski SP, Teixeira TF, Colling LC, Mastrogiovanni M, et al. A rabies vaccine adjuvanted with saponins from leaves of the soap tree (*Quillaja brasiliensis*) induces specific immune responses and protects against lethal challenge. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(20):2305–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.070>
 53. Cibulski SP, Rivera-patron M, Mourglia G, Casaravilla C, Carolina A, Yendo A, et al. *Quillaja brasiliensis* saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Sci Rep*. 2018;(March).
 54. Mowat AM, Reid G. Preparation of Immune Stimulating Complexes (ISCOMs) as Adjuvants. In: Coligan JE [et A, editor. *Current Protocols in*

- Immunology. 1995. p. 1–12.
55. Silveira F, Rossi S, Fernández C, Gosmann G, Schenkel E, Ferreira F. Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. *Phyther Res.* 2011;25(12):1783–8.
 56. Cibulski SP, Silveira F, Mourglia-ettlin G, Fumaco T, Fernandes H, Yendo AC, et al. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;45:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.004>
 57. Mastrogiovanni M. Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de Quillaja brasiliensis. [Internet]. Facultad de Ciencias, Udelar.; 2012. Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1442/1/uy24-16066.pdf>
 58. Kite GC, Howes MJR, Simmonds MSJ. Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of Quillaja saponaria by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(23):2859–70.
 59. Nord LI, Kenne L. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from Quillaja saponaria Molina. *Carbohydr Res.* 1999;320(1–2):70–81.
 60. Nord LI, Kenne L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from Quillaja saponaria Molina. *Carbohydr Res.* 2000;329(4):817–29.
 61. Myschik J, Lendemans DG, McBurney WT, Demana PH, Hook S, Rades T. On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. *Micron.* 2006;37(8):724–34.
 62. Yendo ACA, De Costa F, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG. Irradiance-based treatments of Quillaja brasiliensis leaves (A. St.-Hil. & Tul.) Mart. as means to improve immunoadjuvant saponin yield. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015;74:228–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.052>
 63. Bertona D, Pujato N, Bontempi I, Gonzalez V, Cabrera G, Gugliotta L, et

- al. Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(10):1293–303.
64. O’Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 2000;10(12):542–50.
65. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway.* 7th ed. Mexico; 2009.