



UTILIZACIÓN DE SAPONINAS NATURALES COMO ADYUVANTES DE VACUNAS CON IMPACTO EN LA SALUD HUMANA

COMPONENTES DEL EQUIPO

Pamela Galetta
Jennifer Larrarte
Florencia Melo
Leidy Palacios
Magela Rodríguez

ORIENTADOR

Asist. Dr. Fernando Silveira



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	2
2. FUNDAMENTACION.....	3
3. INTRODUCCION.....	4
3.1 PRINCIPALES ADYUVANTES	11
3.1.1 ALÚMINA.....	11
3.1.2 MF59	12
3.1.3 MONTANIDE ISO51	13
3.1.4 SAPONINAS.....	14
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL:	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
5. METODOLOGIA	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1 ¿POR QUÉ SAPONINAS?	22
6.2 SAPONINAS LATINOAMERICANAS ¿LA ALTERNATIVA ESTÁ EN CASA?.....	25
7. CONCLUSIONES	28
8. BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN

En esta monografía se exploran cuatro tipos de adyuvantes vacunales Alum, MF59, MONTANIDE ISO 51 y Saponinas. Se parte desde el hito que supuso la vacunación a nivel sanitario y social para luego caracterizar los perfiles de beneficios y efectos adversos de cada adyuvante. Nos proponemos determinar por qué las saponinas son una buena alternativa para superar los retos que impiden un acceso universal a vacunas para combatir infecciones intracelulares y enfermedades crónicas. Se realizó una búsqueda bibliográfica de la cual se seleccionaron 61 artículos para el presente trabajo. Resultados: las saponinas latinoamericanas son una buena opción adyuvante demostrando menor actividad hemolítica y efectos adversos que las saponinas Quil A[®]. De este análisis preliminar surgen evidencias claras de la necesidad de profundizar en éstas investigaciones como también de una mayor integración básico – clínica.

2. FUNDAMENTACIÓN

Las vacunas son un excelente logro de la investigación biomédica que ha promovido una mejora significativa en la calidad de la vida humana y la sanidad animal.

En general, los preparados vacunales que contienen antígenos solubles puros, (recombinantes o sintéticos) han resultado ser seguros, pero con una menor inmunogenicidad, que aquellos preparados formulados con antígenos crudos. En efecto las formulaciones con antígenos crudos desencadenaban fuertes respuestas inmunes, sin embargo también desencadenaban importantes reacciones adversas. Partiendo de esta base, actualmente existe una fuerte tendencia mundial al desarrollo de vacunas que sean efectivas contra un gran número de patógenos y que a la vez sean seguras cuando son administradas en humanos y animales.

El agregado de diferentes compuestos a las formulaciones vacunales con antígenos purificados provee las señales necesarias para generar respuestas inmunes adecuadas. Estos compuestos de origen diverso se conocen como *adyuvantes*. Pocos adyuvantes han sido aprobados para su uso en humanos, siendo los más utilizados las sales de aluminio (alúmina) y un adyuvante oleoso (MF59). Sin embargo, ambos adyuvantes fallan en activar determinadas células del sistema inmune como son las células citotóxicas o CD8+ necesarias para combatir infecciones intracelulares como (malaria, tuberculosis) y cáncer.

Actualmente existen nuevos compuestos que se encuentran en fase de investigación, siendo los productos naturales con actividad adyuvante una interesante alternativa. Dentro de ellos destacamos las preparaciones de saponinas, que aunque su uso en humanos es restringido, ha sido objeto de estudios, ya que promueve potentes respuestas de tipo humoral y celular con activación de células CD8+ para combatir patógenos intracelulares.

En el presente trabajo, se comparara la efectividad de algunos adyuvantes (alúmina, MF59, Montanide ISO51 y saponinas) para desencadenar respuestas

inmunológicas adecuadas. Se analizarán los datos encontrados en la literatura referente a los productos naturales como adyuvantes de vacunación haciendo especial énfasis en las saponinas y su posible impacto en la salud humana.

3. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) a excepción de la depuración del agua, ningún otro factor ha ejercido mayor impacto en la reducción de la mortalidad como lo han hecho las vacunas(1).

A lo largo de la historia, las preparaciones vacunales se han utilizado para el control de diferentes procesos infecciosos tanto en humanos (viruela, poliomielitis, difteria, rabia entre otras), como en animales. Sin embargo, siguen existiendo importantes retos de investigación contra diferentes patógenos como son el VIH, la Hepatitis C, parásitos causantes de Malaria, agentes causantes de la enfermedad de Chagas y la tuberculosis entre otros. También existe un amplio camino por recorrer sobre el concepto de vacunas aplicadas en la terapéutica del cáncer, enfermedades infecciosas crónicas y enfermedades autoinmunes, etc. (2).

La estimulación deliberada de la respuesta inmune se conoce como *inmunización*. Este proceso se caracteriza por su capacidad de desencadenar una respuesta protectora frente a un patógeno y generar memoria. La exposición a un patógeno, posterior a una inmunización activa (vacunación), lleva a la eliminación del mismo o a la prevención de las enfermedades generadas por sus productos. Este proceso es el que se busca reproducir mediante la administración de las vacunas (3).

La palabra vacuna, deriva del latín *vacca*, es decir “vaca” (4). Hace referencia a preparados de partículas derivadas de microorganismos muertos, vivos o atenuados que al ser inoculadas en un huésped, generan una respuesta inmunológica protectora. Las vacunas contienen otros componentes, como conservantes, estabilizantes, residuos de manufacturación y adyuvantes (5).

Sus principales vías de administración son la subcutánea, intramuscular y

algunas vía oral (Tabla 1).

Tabla 1 Vías de administración de inyectables vacunales (5)

MÉTODOS DE APLICACIÓN DE VACUNAS		
Inyectables	Subcutáneas	Tuberculosis, <i>Nesseria meningitidis</i> A y C, Sarampión, Rubeola, Parotiditis, Influenza, Varicela, Fiebre amarilla.
	Intramusculares	BCG, Tétanos, Tos ferina, Influenza tipo b, Neumonía, Cólera, Poliomieltis (virus inactivados), Hepatitis A, Rabia
Vacunas orales	Poliomieltis (virus vivo atenuado), Rotavirus	

No se conoce con exactitud cuando tuvieron lugar los primeros intentos de inmunización activa. Se ha reportado que el primer intento científico de vacunación lo realizó Edward Jenner, a quien se le puede considerar como el padre de la vacunología junto a Pasteur. Jenner (6) inoculó en humanos el material de las vesículas de la “*variola vaccinae*”, una enfermedad del ganado vacuno producida por un *Orthopoxvirus* similar al virus de la viruela y obtuvo protección de los inoculados frente a la viruela. Esta innovación sufrió cambios médicos y tecnológicos a lo largo de los años, teniendo como resultado final la erradicación de la viruela humana (6). Pasteur, cien años más tarde demostró que era posible generar inmunización para una enfermedad determinada utilizando el microorganismo causante de la misma siempre y cuando este estuviera atenuado. A diferencia de Jenner quien había utilizado un virus similar (promoviendo protección cruzada) al de la enfermedad para la cual quería lograr protección (5). Estos dos acontecimientos resultaron ser muy importantes en el posterior desarrollo de la inmunización profiláctica contra las enfermedades infecciosas (7).

La iniciación de una respuesta inmune frente a un patógeno determinado se lleva a cabo por el sistema inmune. Para una mejor comprensión del mismo, la respuesta inmune tradicionalmente se estudia dividiéndola en dos tipos de reacciones, la primera conocida como respuesta inmune innata y la segunda

denominada respuesta adaptativa o adquirida. Se puede decir que la respuesta innata esta mediada por células y factores solubles que se activan inmediatamente en respuesta a la infección o inoculación de un patógeno, se caracteriza por desencadenarse rápidamente, y carece de memoria inmunológica. Entre sus componentes se destaca las barreras epiteliales, las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células *natural killer* (NK), células dendríticas (CD) y proteínas plasmáticas entre las que encontramos el sistema de complemento y citoquinas. El reconocimiento del patógeno lo realizan las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés, *antigen presenting cell*) como son las CD, las cuales son portadoras de receptores específicos (codificados en la línea germinal) que reconocen diferentes motivos estructurales en los patógenos. Estos receptores son denominados en conjunto “receptores de reconocimiento de patógenos” (PRRs; del inglés *Pattern recognition receptor*). Algunos de ellos son los receptores tipo Toll, (TLR), los Lectina de tipo C, (receptores fagocíticos), citosólicos conocidos como NLR (Nod1 y Nod2), entre otros. En resumen, estos receptores presentes en las células de la inmunidad innata reconocen estructuras altamente conservadas en la fisiología de los patógenos, que colectivamente se las ha denominado como “patrones moleculares asociados a patógenos, (PAMPs, del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*) o “patrones asociados a daño celular” (DAMPs, del inglés: *Danger-Associated Molecular Patterns*)(8-10).

Por otro lado, la respuesta adaptativa desencadena reacciones más complejas, que permiten disponer de una respuesta de alta precisión. En este caso, las células efectoras reconocen a través de receptores específicos estructuras únicas y diferenciales de las múltiples partículas que contienen los patógenos. Hay un reordenamiento genético de los receptores, lo cual hace que el sistema responda a una amplia variedad de antígenos (Ag). Otra característica de la inmunidad adquirida es que se generan células memoria en la primera exposición al Ag haciendo que ante la re-exposición al mismo se desencadene una respuesta inmune más rápida e intensa que la primera. Está integrada por componentes de la inmunidad celular y humoral. La inmunidad celular depende fundamentalmente de los linfocitos T (LT), siendo el principal mecanismo de

defensa frente a microorganismos intracelulares y células tumorales mientras que la inmunidad humoral está a cargo de los linfocitos B (LB) y las diferentes clases de anticuerpos (Ac) que estos secretan. Por último la inmunidad adaptativa tiene un periodo de latencia, requerido para la proliferación y diferenciación de los LT y LB antígenos específicos, lo que determina que la respuesta efectora no sea inmediata (8-10).

La activación de los linfocitos T depende de las interacciones con las APC las que se activan directamente por la interacción de sus PPRs con los PAMPs y DAMPs presentes en los patógenos. Los LT activados proliferan y se movilizan para proteger al individuo, interaccionando con otras células inmunes y así generar las señales necesarias que desencadenan la muerte y posterior eliminación del patógeno o células infectadas. Entre las células inmunes con las cuales interaccionan los LT se encuentran los LB que producen anticuerpos. Los LT colaboran dirigiendo los tipos de Ac que los LB deberán producir, es de este modo que se genera una respuesta inmune óptima para proporcionar protección específica. Al final de este proceso, la mayoría de las células B y T activadas se someterán a una muerte celular programada (apoptosis), pero un número pequeño permanecerá como células de memoria, quedando preparadas para defender el organismo, en caso de que el huésped se exponga otra vez al mismo patógeno infeccioso (8).

Como ya se mencionó, las vacunas deben trabajar de una manera similar, generando un tipo de respuesta inmune apropiada, a su vez esta respuesta tienen que tener la capacidad de generar células de memoria para responder en caso de una reinfección con el mismo patógeno.

Las vacunas con Ag crudos han promovido inmunizaciones relevantes, sin embargo, generan reacciones adversas de gran importancia. Por este motivo en las últimas décadas se han desarrollado formulaciones vacunales con Ag purificados o recombinantes que reducen dichos efectos secundarios. Es así que se lograron vacunas más seguras, pero con la consecuencia de perder inmunogenicidad. En este contexto surgió la necesidad de adicionar al Ag purificado sustancias o preparaciones químicas que mejoren la entrega y el

procesamiento del Ag, estimulando de esta forma tanto la inmunidad humoral como también la celular. Estos compuestos de origen diverso se denominan *adyuvantes*. La búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante o inmunopotenciadora constituye una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica actual (11).

La evidencia científica disponible sugiere que los adyuvantes emplean uno o más de los siguientes mecanismos para provocar respuestas inmune: liberación sostenida del antígeno en el sitio de la inyección (generan efecto depósito), regulación de citoquinas, reclutamiento celular en el sitio de inyección, aumento de la captación del Ag y su presentación a las APC, estimulan la activación y maduración de las APC, e influyen en su migración a los ganglios linfáticos de drenaje, por último se les atribuye la capacidad de activar el inflammasoma (12).

Existen algunos adyuvantes habilitados para su uso en humanos y otros se encuentran aún en etapa de investigación. En la tabla 2, se expone una descripción de las características fisicoquímicas e inmunológicas de los principales grupos de adyuvantes, y más adelante, se describirá su mecanismo de acción.

Los adyuvantes más utilizados han sido las sales de aluminio mayoritariamente conocida como (alúmina) y el MF59 (un adyuvante oleoso). El primero genera una fuerte respuesta humoral con la participación de LT de tipo Th2 mientras que el MF59 genera Ac con la colaboración de LT de tipo Th1. Sin embargo, ambos adyuvantes fallan en activar células del tipo CD8+ o citotóxicas necesarias para combatir infecciones intracelulares como la malaria, la tuberculosis y el cáncer. La búsqueda de nuevas sustancias que generen repuestas inmunes apropiadas de LT, Th1, con buenos títulos de Ac, y en particular con linfocitos T citotóxicos (CTL+), constituye actualmente un reto para la investigación (13, 14).

Entre los adyuvantes que se encuentran en fase de investigación con la propiedad de activar LT citotóxicos destacamos a las *saponinas*. Las saponinas

son compuestos de origen natural utilizados como adyuvantes en medicina veterinaria desde hace décadas. Las preparaciones de saponinas de Quil A[®] (derivadas del árbol Chileno *Quillaja saponaria*) han sido estudiadas por promover potentes respuesta de tipo humoral y celular, con activación de las células CTL+ necesarias para generar inmunidad contra patógenos intracelulares. Sin embargo, el uso de estas saponinas se ha visto restringido en humanos por ser hemolíticas y producir reacciones locales no deseadas en el sitio de inyección (15, 16).

Tabla 2: Principales adyuvantes aprobados para uso en humanos y en fase de experimentación. (Abreviaciones: Ac, anticuerpo; Ag, antígeno; Th, células T helper; TLR, receptor Toll-Like; CTL, linfocito T citotóxico; MPL, lipo polisacárido A (5, 8, 9))

ADYUVANTES CON LICENCIA PARA USO EN HUMANOS					
ADJUVANTE	COMPONENTE	RECEPTOR	MECANISMO DE ACCION	PRINCIPAL RESPUESTA	VACUNA
Alúmina	Sales de Aluminio	NLRP3, ¿inflama - soma?	Independiente de la señalización de TLR, aumento local de citoquinas y quimoquinas, aumento de reclutamiento celular (Eosinófilos, monocitos y macrófagos), aumenta la presentación de Ag.	Ac Th2 (+ Th1 en humanos)	Difteria, Tétanos, Neumococo Hepatitis A y Hepatitis B.
MF59	Emulsión de Escualeno en agua	Inflamación Tisular (Receptor no definido)	NLRP3 Y TLR independiente, ASC y MyD88 dependiente. Aumento local de citoquinas y quimoquinas, aumento de reclutamiento celular (Neutrófilos, monocitos y macrófagos), aumenta la presentación de Ag	Ac Th1+ Th2	Influenza
ASO3	Emulsión de Escualeno en agua	Inflamación Tisular (Receptor no definido)	Transitorio aumento de citoquinas locales y dLNs, Aumento de reclutamiento de células (Granulocitos y monocitos)	Ac Th1+ Th2	Influenza
ASO4	Hidróxido de Aluminio y MPL	TLR4, ¿inflama - somas?	Señales MLP a través de TLR4 para activar APC, transitorio aumento de quimoquinas locales, reclutamiento de células (Monocitos)	Ac Th1	HPV (Virus del Papiloma Humano) HBV (virus de la Hepatitis B)
Virosomas	Liposoma		Vehículo de entrega del Ag	Aumenta respuesta de Ac Y CyL	HAV (Virus de Hepatitis A)
ADYUVANTES EN FASE DE EXPERIMENTACION TARDÍA PARA USO EN HUMANOS					
ADJUVANTE	COMPONENTE	RECEPTOR	PRINCIPAL RESPUESTA	VACUNA	
Poli-IC	Derivado sintético de ARNds	TLR3, MDA5	Ac, Th1, CD8+ células T		
MPL, ASO1 y ASO2	MPL y QS-21	TLR4(MPL) (QS21)	Ac, Th1	Malaria, TB, Cáncer	
<i>Flagelina</i> ,	Flagelina de <i>S.typhimurium</i>	TLR5	Ac, Th1+Th2	Influenza	
Imiquimods	Derivado de Imidazoquinolona	TLR7, TLR8	Ac, Th1,CD8+Celulas T	Cáncer	
CpG		TLR9	Ac,Th1, CD8+ Células T	HBV, influenza	
ISCOMS ISCOMATRIX	Saponinas	Desconocido	Ac, Th1, Th2,CD8+ ,CTL+	HCV, influenza, HPV, Cáncer	

3.1 PRINCIPALES ADYUVANTES

3.1.1 ALÚMINA

Es una sal mineral que se encuentra en forma de fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. Estas partículas actúan adsorbiendo al antígeno, lo cual aumenta su estabilidad aumentando la eficacia del adyuvante.

Se destaca su bajo costo, su seguridad y aplicabilidad a varios antígenos. Pero tiene limitaciones, como ser la poca capacidad para estimular la inmunidad celular (necesaria para patógenos intracelulares y células tumorales por ejemplo); la producción elevada de IgE lo cual causa reacciones alérgicas y la formación de granulomas en el sitio de inyección (17).

Se ha usado como adyuvante en la mayoría de las preparaciones vacunales para humanos. Estas formulaciones contienen antígenos virales como bacterianos, algunos ejemplos pueden ser: difteria, tétanos, pertussis, hepatitis A y B, entre otras (14).

Induce preferentemente una respuesta tipo Th2, caracterizada por la alta producción de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgE) y la secreción de diferentes citoquinas (IL-4, IL-5 e IL-6) (18).

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual este adyuvante promueve una respuesta inmune exitosa, para explicar este punto se han planteado varias hipótesis: 1) La alúmina induce inflamación local en el sitio de inyección, 2) se forma un depósito que facilita por más tiempo la captación del antígeno por la APC, 3) interactúa a través de lípidos de superficie estimulando la cascada de activación celular permitiendo el inicio de la respuesta inmune (14), 4) poco tiempo después de la vacunación se ven efectos locales de reclutamiento, aparecen citoquinas pro-inflamatorias, monocitos, CD y células NK, neutrófilos, eosinófilos. En este contexto las citoquinas facilitan el reclutamiento y estimulan aparición de APC en el sitio de inyección (14).

La estimulación de las CD a través de la liberación de ácido úrico proveniente de células dañadas por la citotoxicidad de la alúmina, actúa como un DAMP, e

induce el reclutamiento de monocitos al sitio de inyección, los cuales migran al ganglio linfático, maduran y estimulan LT CD4 (11, 14). La alúmina estimula macrófagos y células dendríticas para producir IL-1 β e IL-18 a través de la activación del inflamasoma. El mecanismo no está claro, y tampoco se ha comprobado en todos los estudios experimentales (18).

La activación de la inmunidad innata por los DAMPs parece ser un mecanismo crítico para la actividad adyuvante. La alúmina induce la acumulación local de ADN del huésped en el sitio de inyección al producir muerte celular. Esto dispara la respuesta inmune inicial. Estas respuestas no son dependientes de TLRs, ni del inflamasoma, y el mecanismo por el cual el ADN del huésped dispara la respuesta inmune no está claro (19).

También se han probado mezclas de diferentes adyuvantes por ejemplo, AS04 combinación de alúmina con monofosforil lípido A (MPL). Esta combinación promueve potentes respuestas tipo Th1, con una mejoría de las respuestas Th2 inducidas por la alúmina. Otras combinaciones de adyuvantes deben ser exploradas.

Los avances en investigación de adyuvantes abren nuevas posibilidades para el tratamiento no sólo de enfermedades infecciosas, sino también alergias y cáncer (18, 20).

3.1.2 MF59

Entre los adyuvantes independientes de receptores TLR, la alúmina ha sido ampliamente utilizada en vacunas humanas por más de 70 años, mientras que la emulsión de aceite en agua MF59 fue autorizado para su uso hace más de una década.

El MF59 es la emulsión de aceite en agua que más se ha evaluado su uso como adyuvante. Es una emulsión microfluídica que contiene un aceite -escualeno y Span-85 en un buffer de citrato de sodio (21).

MF59 se ha utilizado como adyuvante con una serie de antígenos diferentes,

se ha autorizado su uso en combinación con la vacuna para influenza estacional dirigida a ancianos en Europa (22). Se ha demostrado que MF59 promueve la captación de Ag por las células dendríticas *in vivo*.

Esta emulsión estimula una fuerte respuesta de Ac, y la generación de memoria Th2 y Th1. MF59 induce una estimulación local, reclutando CD, granulocitos y promueve la diferenciación de monocitos a CD así como aumenta la captación de Ag por estas células (23).

Recientemente se ha demostrado que estas emulsiones estimulan la respuesta inmune de forma indirecta. En la inyección intramuscular, las fibras musculares son células diana de MF59, donde este induce la producción de TNF alfa, IL beta y CCLs, conduciendo a la activación de CD residentes y reclutando y activando las APC circulantes.

En resumen, los efectos del MF59 consisten en generar un entorno inmunoestimulador local en el lugar de inyección, que activa las células inmunitarias locales. Esto da lugar a una maduración de las CD residentes, un reclutamiento y activación adicional de células inmunitarias hacia el lugar de inyección, un aumento de la captación de Ag, promoviendo la maduración de las CD y una mayor migración de las APC hacia los ganglios linfáticos locales (24).

3.1.3 MONTANIDE ISO51

Los adyuvantes (agua en aceite) (W/O) están compuestos por una emulsión de agua en aceite mineral. Freund (1936) reportó el adyuvante completo de Freund (ACF) es decir, la emulsión acuosa en aceite con micobacterias muertas (25). Posee una alta reactogenicidad debido a que las micobacterias con sus estructuras intactas reconocidas como PAMPs por el sistema inmune generan una respuesta inflamatoria exacerbada (26). De allí que se formuló una emulsión sin micobacterias muertas a la que se denominó adyuvante incompleto de Freund (AIF) (27).

Un ejemplo de adyuvantes W/O son los de tipo Montanide usados para cáncer,

enfermedades autoinmunes y VIH. Es calificado como un buen adyuvante activando la respuesta inmune celular a través de la activación de los CTL y también la respuesta inmune humoral. Se ha usado en más de 10000 pacientes (28).

Dentro de los efectos secundarios se encuentran reacciones inflamatorias, granulomas y úlceras en el sitio de inyección. Algunos adyuvantes W/O agregan aceites metabolizables y emulsificantes para lograr estabilidad, potencia y menos toxicidad (29). También se han reportado la formación de quistes o abscesos estériles en el sitio de inyección así como una relación entre el número de administraciones y los efectos adversos (30).

Se formuló la vacuna CIMAvax-EGF contra el cáncer de pulmón registrada para uso humano en Cuba con el EGF humano recombinante, la proteína p64k de *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciador y usando Montanide ISO51 VG, como adyuvante (32-34).

Esta vacuna se basa en concepciones que postulan a la inmunodeprivación activa de EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) como forma de que la respuesta inmune del individuo dispare efectores contra el factor de crecimiento tumoral logrando una interrupción eficiente de la transducción y señalización (35).

3.1.4 SAPONINAS

Son moléculas naturales que se encuentran ampliamente distribuidas en diversas especies de plantas (36). Están formadas por una aglicona triterpénica o esteroideal lipofílica unida a través de un grupo hidroxilo, carbonilo o ambos a una o más cadenas ramificadas de azúcares hidrofílicos. Su característica distintiva es que debido a su carácter anfipático son tensoactivas lo que determina que generen micelas en agua y formen espuma al ser agitadas (37).

3.1.4.1 Propiedades biológicas de saponinas:

A continuación se mencionaran algunas propiedades biológicas de las saponinas de interés en humanos:

- Antiinflamatoria: las saponinas inhiben la inflamación sugiriendo que ocurre a través de la inhibición de la vía clásica del complemento (38). Diferentes estudios señalan a las saponinas triperpénicas y en particular al grupo hidroxilo en C-23 como responsables de esta actividad ya que la modificación del grupo metilo en el C-23 de la aglicona elimina dicha actividad (39).
- Antifúngica: es dependiente de la estructura química, por eso no se observa en todas las saponinas. Si bien esta actividad es menor que la que presentan agentes antifúngicos podría haber una acción sinérgica entre diversas saponinas (40).
- Antiparasitaria: algunas saponinas han demostrado actividad mediante cambios en la integridad y potencial de membrana contra el parásito *Leishmania infantum*. Éstas últimas también mostraron actividad antiproliferativa contra monocitos humanos al inhibir la síntesis del ADN lo que sugiere que estas saponinas pueden usarse en un futuro como una droga anti leishmania o como complemento al tratamiento (41).
- Antitumoral y citotóxica: muchos estudios sugieren que varios tipos de saponinas así como sus mezclas tienen alta actividad citotóxica - dada tanto por la aglicona como por las cadenas de azúcares - pero ésta no siempre se acompaña de actividad antitumoral (42).
- Antiviral: se ha observado en las saponinas triterpénicas (43). Hay evidencia de que ocurre por mecanismos mediados por la membrana inhibiendo la replicación del ADN (44).

3.1.4.2 Potencial como Adyuvante

Las preparaciones de saponinas de Quil A® derivadas del árbol chileno *Quillaja saponaria* son las más estudiadas como adyuvante para vacunas tanto de uso humano como veterinario. Se sabe que estimulan la diferenciación de CTLs y la producción de anticuerpos isotipo IgG2a al polarizar la respuesta hacia un tipo Th1 con producción de IL-2 e IFN- γ . Siendo su uso en humanos restringido por ser demasiado reactivas provocando reacciones de dolor, inflamación e induración en el sitio de inyección así como efectos tóxicos (45).

Uno de estos efectos tóxicos es evidenciado por la hemólisis *in vitro*: las saponinas pueden dañar en forma irreversible la membrana de los eritrocitos (46) esto ocurre por la interacción de las cadenas laterales de los oligosacáridos unidas a la aglicona y los residuos acilos de las saponinas con el colesterol de las membranas celulares. Así se forman poros de 80Å que llevan a un aumento en la permeabilidad y pérdida de hemoglobina (13). El nivel de actividad hemolítica es variable entre las diversas saponinas dependiendo del tipo de aglicona y la presencia de cadenas de azúcares y puede eliminarse con la remoción del grupo acilo (47).

Frente un análisis cromatográfico Quil A® muestra que es una mezcla de saponinas. De este fracción se ha aislado un componente puro denominado QS21 (48) con actividad adyuvante y menor toxicidad (Quil A® es letal en ratones a concentraciones de 100 µg/dosis mientras que para QS21 es 500 de µg/dosis) (49). Aún así tiene dos problemas: aunque sea menos tóxica que el compuesto original sigue siendo reactogénica y es inestable químicamente. Su mecanismo de acción se desconoce. Se cree que la lisis de la membrana puede tener un rol importante pero hay evidencia que lo cuestiona. Se encontró que la combinación de QS21 con liposomas conteniendo colesterol genera un aumento de la estabilidad con disminución de la reactogenicidad.

Al agregarle MPL un agonista de TLR4 se reportó un aumento en la actividad adyuvante y así se generó una nueva formulación denominada AS01. Ésta ha demostrado inducir mayores respuestas de células T CD4 para un antígeno que los mismos inmunoestimulantes combinados con emulsiones oleosas (24).

La gran afinidad de Quil A® al entrar en contacto con membranas conteniendo colesterol llevó al desarrollo de nanoformulaciones conocidas con el nombre de ISCOMS (50) (ISCOM, del inglés, *Immune stimulating complexes*). Los ISCOMS son ensamblajes micelares de saponinas de Quil A® parcialmente purificadas asociadas, fosfolípidos colesterol y un Ag determinado. Estudios posteriores mostraron que no era necesario el ensamblaje en presencia del Ag, así surgieron preparados más simples llamados ISCOMATRIX™ (ver Figura 1) cuya única diferencia es que el antígeno se agrega en una etapa de

formulación posterior. Estos complejos tienen un efecto adyuvante fuerte manteniendo la actividad inmunomoduladora con menor reactogenicidad que el compuesto original reduciendo su efecto hemolítico y sin otros efectos adversos graves (24).

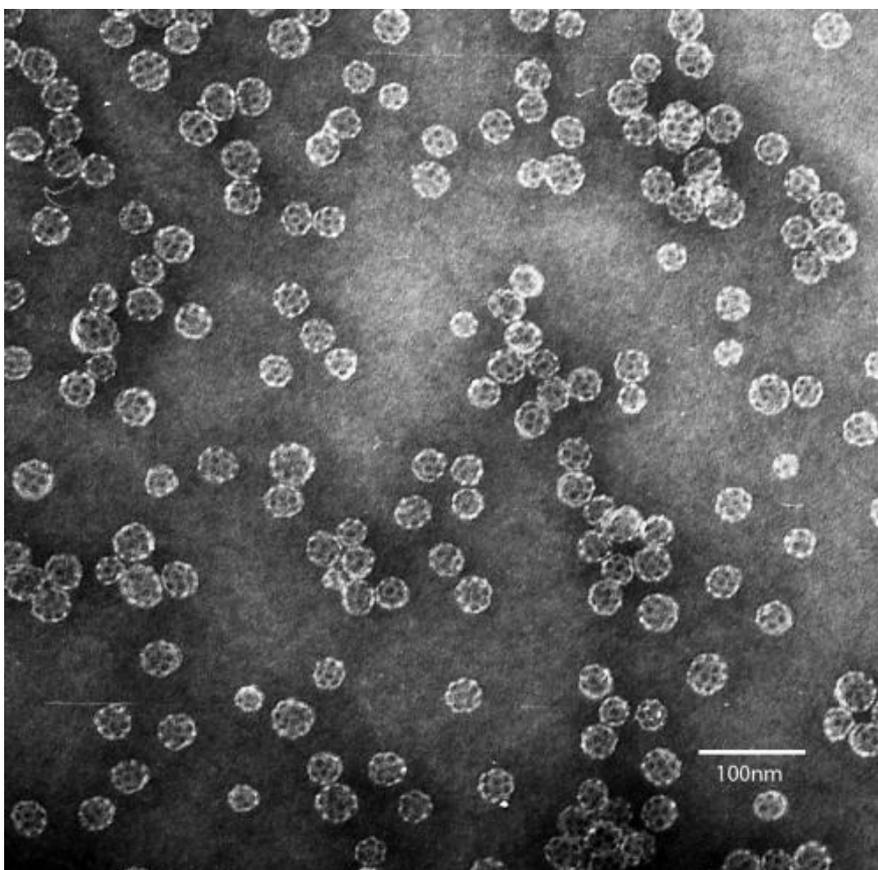


Figura 1. Microfotografía electrónica del adyuvante ISCOMATRIX™ luego de realizar tinción negativa. Extraído de Sanders et al. (51).

En las últimas décadas otras saponinas se han propuesto como alternativa a las saponinas de Quil A®. La fracción de saponinas denominada QB-90U extraída de las hojas de *Quillaja brasiliensis* (ver, Figura 2), árbol con gran distribución en Brasil, Argentina y Uruguay ha demostrado poseer una gran actividad adyuvante similar a Quil A®. Tanto estudios *in vivo* (52) como *in vitro* (15) utilizando QB-90U demostraron menor toxicidad cuando fue comparada con Quil A®. En ratones estimula respuestas tanto de tipo humoral como celular contra el herpesvirus de tipo I (BoHV-1) y 5 (BoHV-5) similares a las generadas por Quil A (52). Otro aspecto de interés es el impacto

medioambiental ya que la sobreexplotación de la corteza de *Quillaja saponaria* para la obtención de saponinas aunado a su lento crecimiento conduce a una escasez de este recurso. Como alternativa se ha propuesto a *Q. brasiliensis* ya que las saponinas se obtienen de sus hojas siendo una fuente sustentable y renovable de saponinas (53, 54).



Figura 2. Fotografía de *Quillaja Brasiliensis* Imagen tomada del sitio Wikipedia: http://es.wikipedia.org/wiki/Quillaja_brasiliensis#mediaviewer/File:Quillaja_brasiliensis_0601_000.jpg

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Conocer los diferentes adyuvantes aprobados y en fase de investigación para vacunas de uso en humanos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

A) Conocer la influencia que han ejercido las vacunas en la inmunización humana

C) Describir las características de los adyuvantes.

B) Identificar la respuesta humoral y celular que promueven los adyuvantes seleccionados: Alúmina, MF 59 y MontanideISO51 y en base a saponinas .

C) Estudiar el perfil de seguridad y los efectos adversos de los adyuvantes seleccionados.

D) Exponer los conocimientos sobre saponinas sudamericanas.

E) Plantear el potencial de las saponinas como nuevo adyuvante de vacunación.

5. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva en Junio 2014 teniendo por objetivo conocer los diferentes adyuvantes aprobados y en fase de investigación para vacunas de uso humano y veterinario con el fin de justificar la necesidad de nuevos productos adyuvantes para la realización de vacunas más efectivas y seguras, haciendo especial énfasis en los productos naturales y dentro de estos en las saponinas.

Para la búsqueda bibliográfica (ver Figura 3) se utilizaron fuentes de datos primarias como ser libros (ej: *Inmunología Molecular y Celular Abbas*, etc), revistas científicas, como *Journal of Vaccine*, *Journal of Ethnopharmacology*, *Nature medicine*, tesis, entre otras.

También fuentes de datos secundarias, dentro de ellas el buscador más utilizado fue *Pubmed*. La estrategia de búsqueda consistió en palabras clave:, *plant saponins vaccine*, *saponins adjuvant*, *natural saponins and haemolytic activity*, *non haemolytic saponins*, *saponins and alum*, *MF59 adjuvant*, *montanide adjuvant*, *plant saponins and vaccine*, *CIMAVAX-EGF*, *vaccination history*, *quillaja brasiliensis*, *cancer vaccine*, *progress research adjuvant*, *innate immunity*, *cellular and humoral immunity*. Los filtros utilizados fueron para un periodo de tiempo entre los años 1999-2014. Los tipos de artículos preferentemente fueron revisiones, aunque también se utilizaron ensayos clínicos. La disponibilidad del texto elegida, fue texto completo libre.

En base a la información encontrada se seleccionaron y analizaron los artículos de forma crítica, evaluando su calidad y validez científica, lo cual permitió realizar una síntesis y combinación de los datos obtenidos.

Luego se incluyeron artículos originales de descubrimientos del área que no entraban en nuestro criterio temporal de búsqueda y artículos relevantes de acuerdo a referencias o de acuerdo a los autores de los artículos seleccionados.

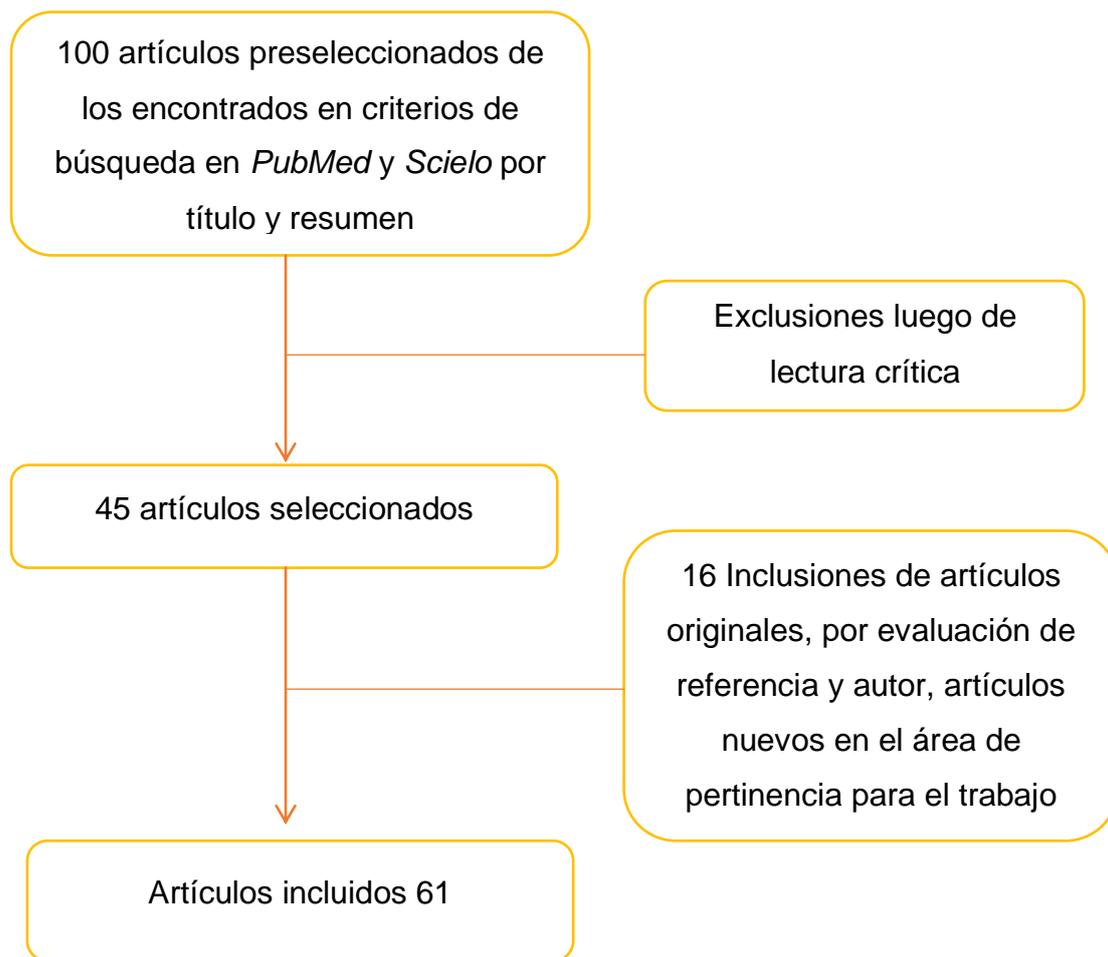


Figura 3. Algoritmo de búsqueda

6. RESULTADOS

“Me parece que todos miramos a la naturaleza demasiado y vivimos con ella demasiado poco”. Oscar Wilde.

6.1 ¿POR QUÉ SAPONINAS?

Los principales adyuvantes aprobados para uso en humanos estimulan en forma preferencial una respuesta inmune humoral con células T CD4+ de fenotipo Th2 mientras que carecen de capacidad de estimular la diferenciación de células T CD8+ (24). Esto hace que no sean efectivos contra patógenos intracelulares y células malignas. Desarrollar adyuvantes capaces de inducir tanto respuestas de tipo humoral como celular para el tratamiento preventivo o terapéutico de cáncer así como de infecciones virales para las que aún no existen vacunas efectivas como son la malaria, la tuberculosis y el VIH no solo es atractivo para la academia y la industria sino necesario.

Los avances en materia sanitaria han cambiado el perfil epidemiológico a nivel mundial. Excepto en África, la principal causa de muerte son las enfermedades crónicas. Las muertes por esta causa para 2005 se estimaron por la OMS en 35 millones siendo el doble de todas las muertes de causa infecciosa (incluyendo VIH/SIDA, malaria y tuberculosis) combinadas. El impacto de las enfermedades crónicas se observa en múltiples niveles. Primero en el enfermo por el aumento de riesgo de muerte o incapacidad, las comorbilidades asociadas y los costos de tratamiento y cuidados. Se ha observado que si bien las enfermedades crónicas aumentan primero en la población más rica luego pasa a concentrarse en los segmentos más pobres pudiendo ser un factor de perpetuación de la pobreza (55). Esto supone un alto costo para los países impactando en el desarrollo económico. Existe evidencia clara de la necesidad de intervenciones para prevenir y controlar estas enfermedades ya que como se muestra en la figura 4 los gastos por cuidados de cáncer aumentarán en los próximos años debido al aumento de la sobrevivencia para el cáncer, uso de tratamientos más costosos y el aumento de la esperanza de vida (56).

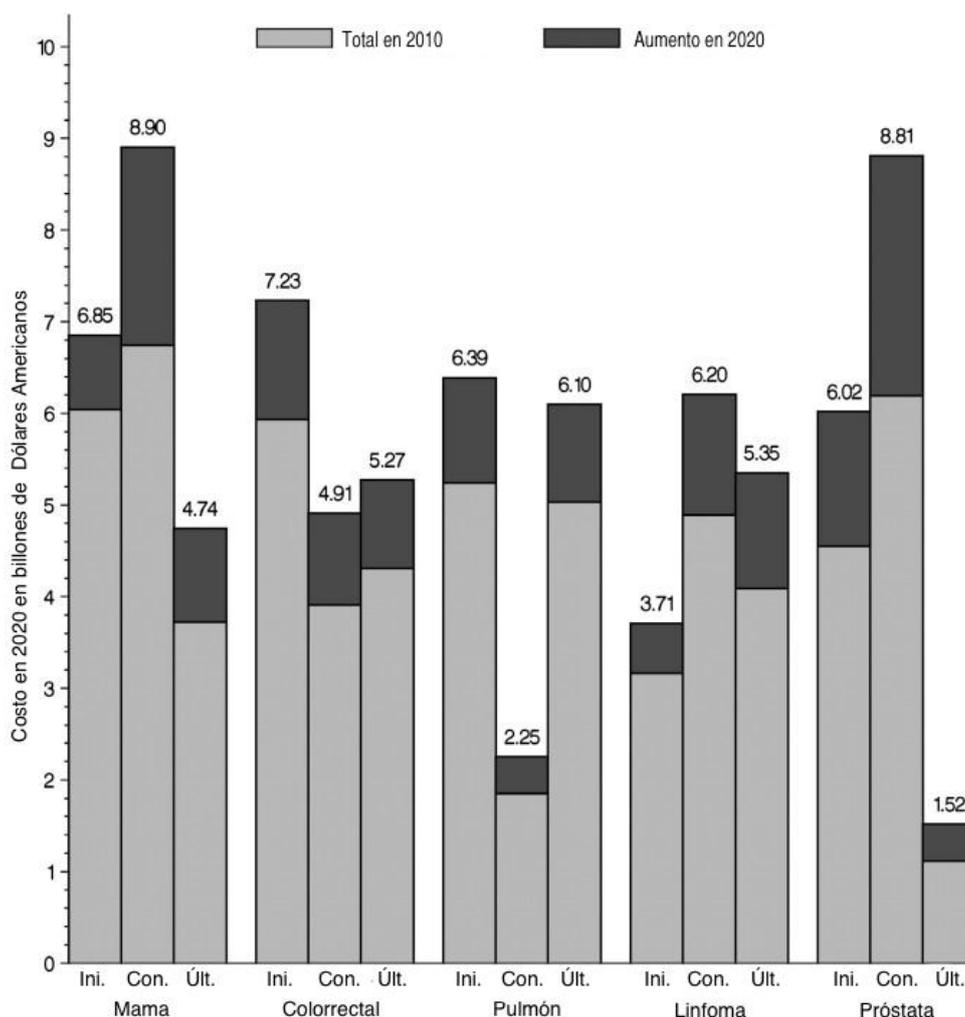


Figura 4. Estimaciones de los gastos en Estados Unidos por cuidados del cáncer en 2010 (áreas gris claras) y el aumento estimado del costo en 2020 (áreas gris oscuro) debido al envejecimiento y crecimiento de la población americana asumiendo la constante incidencia de supervivencia y el costo para los principales órganos afectados. Costos en billones de Dólares Americanos en 2010 por fase de cuidado: inicial un año luego del diagnóstico (Ini.), tratamiento continuado (Con.) y último año de vida (Last.) Modificado de Mariotto et al. (56).

Uno de los objetivos de la OMS en su plan global de acción para vacunas (2011 - 2020) es la investigación local, regional y global para desarrollar innovaciones y maximizar los beneficios de la inmunización. Se pone énfasis

en el desarrollo de vacunas contra la malaria, la tuberculosis y el VIH (57).

Conocemos la dificultad de generar respuestas mediadas por linfocitos T potentes y duraderas como también tenemos evidencia de que la inmunidad humoral tiene un rol clave en la infección por VIH e influencia la infección en la malaria pero también que las células Th1, T CD8+ o ambas tienen un rol crítico en estas patologías (11).

Otros objetivos de la OMS son interrumpir la transmisión de poliovirus salvaje a nivel global para 2014 y lograr la erradicación certificada de polio para 2018 (57).

La mejor opción para lograrlo es el uso de la vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV) ya que no tiene las desventajas de la vacuna con polio oral (OPV) como son: la excreción de partículas del virus en heces lo cual perpetúa el virus salvaje y el riesgo de desarrollo de poliomielitis paralítica. Aún así la OPV se sigue utilizando en países subdesarrollados ya que la IPV es más difícil de administrar (vía intramuscular vs vía oral), genera menor inmunidad intestinal y el costo es de 3 dólares por dosis frente a los 5 - 20 centavos que cuesta la OPV (58).

Para estos casos las saponinas se presentan como una alternativa ideal para usar en investigaciones como posible adyuvante para el desarrollo de estas vacunas. Se ha demostrado que tanto Quil A® como las saponinas de *Quillaja brasiliensis* y las de *P. notoginseng* pueden inducir respuestas humorales (Th2) y celulares (Th1) (59, 60).

Recientemente se demostró en un modelo murino con vacunas experimentales usando al poliovirus como antígeno que el extracto acuoso y la fracción QB-90 de *Q. brasiliensis* son capaces de estimular la generación de un patrón de tipo Th1 así como un aumento de la transcripción de IL-2 de casi 17 veces al compararlo con un modelo vacunal sin adyuvante. Por lo cual las saponinas son una buena opción para lograr que la IPV tenga un mejor costo al reducir los requerimientos de antígeno por dosis en vistas a lograr los objetivos establecidos por la OMS para el 2020 (57, 59).

6.2 SAPONINAS LATINOAMERICANAS ¿LA ALTERNATIVA ESTÁ EN CASA?

Como fue expresado anteriormente en el trabajo, el principal desafío que nos enfrentamos al usar las saponinas como adyuvante son sus efectos adversos: reacciones locales, actividad hemolítica y toxicidad sistémica. Así las investigaciones se han centrado en saponinas que tengan menor incidencia de estos efectos y puedan ser usadas como adyuvante de vacunación. Es de particular interés las saponinas que se obtienen de la flora nativa y han demostrado tener el potencial para inducir las respuestas inmunes deseadas.

Dentro de los estudios realizados con saponinas derivadas de árboles nativos, se encuentra el estudio de Silveira et al (2011), en el cual se analiza una fracción de saponina denominada QB-90, proveniente de *Quillaja brasiliensis*.

Q. brasiliensis es un árbol nativo del sur de Brasil, y Uruguay, cuyas hojas contienen gran cantidad de saponinas. La fracción QB-90 tiene similitudes con la saponina Quil A (la más estudiada como adyuvante) (52).

En este trabajo se reportó que la fracción QB-90 posee menos toxicidad que Quil A®. En efecto, estudios *in vitro* de la actividad hemolítica de estas saponinas mostraron que QB-90 fue menos hemolítica que Quil A®. Para QB-90 se produjo un 93.8% de hemólisis a una concentración de 200 µg/mL, en tanto que a 100 µg/mL, (la concentración utilizada en la inmunización), el porcentaje de hemólisis fue de solo 14.4%. Mientras que para Quil A® la concentración usada en el estudio (50 µg/mL) produjo 55% de hemólisis. Lo que permite el uso de la fracción QB-90 a mayores concentraciones, manteniendo la seguridad (15).

Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado en otros estudios en los que se comparan otras saponinas de especies nativas sudamericanas, como es el caso de la especie *Ilex*, árbol de yerba mate, (del cual se obtienen cuatro saponinas) y *Passiflora alata* antiguamente usada en medicina tradicional por sus propiedades sedativas y tranquilizantes (61). Comparando estas saponinas, se encontró una actividad hemolítica mayor para Quil A® frente al resto, con diferencias estadísticamente significativas.

Otro aspecto estudiado fue la citotoxicidad celular. Se realizó un ensayo de toxicidad sobre células VERO. En las concentraciones utilizadas en la vacuna se obtuvo 80% de viabilidad celular en el caso de QB-90, mientras que para Quil A® la viabilidad celular fue de 29% (15).

Estos hallazgos concuerdan con los encontrados al utilizar un modelo murino en donde la fracción aislada de QB-90 no indujo reacciones tóxicas. Se puede concluir que QB-90 es significativamente menos tóxica que Quil A®, a pesar de que estas saponinas son obtenidas de especies relacionadas, y tienen una estructura química similar.

Las fracciones de saponinas QB-90 y Quil A® promueven propiedades similares en el uso como adyuvantes para vacunas contra el Herpes virus bovino (BoHV) (15).

Los niveles de IgG anti-BoHV total, IgG1, IgG2a e IgG2b son significativamente más elevados en los grupos inmunizados con BoHV y adyuvantes que en el grupo control (sin adyuvante). Los grupos inmunizados con Quil A® y QB-90 son los únicos que desarrollan títulos elevados de IgG3 en comparación al grupo control y presentan niveles de IgG2a significativamente superiores a los del grupo inmunizado con alúmina. Quil A® y QB-90 indujeron una fuerte respuesta de anticuerpos frente a BoHV, caracterizada por altos niveles de IgG total y de las distintas subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 que no difieren significativamente entre sí. Las diferencias en los perfiles de producción de los isotipos de IgG entre los preparados con saponinas revelan el tipo de respuesta inmune estimulada por los mismos. Las células Th1 promueven la producción de IgG2a e IgG3 a través del IFN- γ y las células Th2 favorecen el cambio de clase a IgG1 mediante IL-4. Estos datos respaldan que Quil A® y QB-90 tienen un efecto adyuvante similar, activando una respuesta mixta Th1/Th2, a diferencia de la alúmina, que induce preferentemente una respuesta Th2. En otro estudio Fleck et al. (2006), compara la actividad adyuvante entre Quil A® y QB-90 pero utilizando como antígeno Quilvacunal herpes virus bovino tipo 1. Aquellos autores reportan que en las primeras semanas la respuesta a IgG total fue significativamente más elevada con Quil A®. Posteriormente, las diferencias se

redujeron haciéndose no significativas. En este estudio se analizaron extractos de hojas, corteza y ramas del árbol *Quillaja brasiliensis*, con diferentes concentraciones de QB-90, mientras que en el trabajo de Silveira et al. (2011) las saponinas utilizadas se extrajeron solo de las hojas.

La importancia de esos resultados es que abren una nueva perspectiva al uso de las saponinas de origen natural como adyuvante. Actualmente su principal obstáculo es la actividad hemolítica. Se presenta una alternativa a Quil A® con menor toxicidad y tasa de hemólisis pero manteniendo la generación de una fuerte respuesta inmune tanto de tipo celular como humoral.

Otro aspecto importante a destacar es el medioambiental ya que se ha causado daño ecológico por la sobreexplotación de la especie *Quillaja saponaria* por lo cual un mayor número de fuentes de saponinas permitirá una explotación sustentable (52).

En otro estudio (16) se llegó a la conclusión a través de la cuantificación de inmunoglobulinas y de ensayos de hemólisis, que las saponinas con mayor número de unidades de azúcares en las cadenas de carbohidratos, tienen un aumento significativo en el potencial inmune, aumentando la eficacia en adyuvancia, así como también mayor seguridad.

7. CONCLUSIONES

En base a la evidencia analizada, los adyuvantes basados en saponinas suponen una buena alternativa para enfrentar los desafíos de lograr un acceso universal a las vacunas, así como también para desarrollar vacunas contra enfermedades crónicas, el VIH, tuberculosis y la malaria.

Se necesitan mayores investigaciones en esta área, especialmente en lo concerniente a saponinas latinoamericanas dados los buenos resultados encontrados en la literatura.

Creemos importante una mayor integración básico-clínica, elemento que, si bien cabe aclarar que la mayoría de los estudios aún se encuentran a nivel preclínico, nos parece de tipo esencial ya que muchos profesionales de la salud desconocen en qué se encuentran las ciencias básicas y la forma de lograr un impacto en la inmunización en las próximas décadas es utilizando una estrategia interrelacionada donde desde el laboratorio hasta el paciente, todos los actores se sientan parte tanto del problema como de la solución.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO, UNAIDS. Vacunas e Inmunización: Situación Mundial. 2009: Organización Mundial de la Salud; 2009.
2. PAHO, de Quadros CA. Vaccines: Preventing Disease & Protecting Health: Pan American Health Organization; 2004.
3. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28 Suppl 3:C25-36.
4. 22 ed. Madrid, España 2001. Diccionario de la lengua española.
5. Departamento de Bacteriología y Virología IdH. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3era ed. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR; Abril, 2008. 782 p.
6. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2005;18(1):21-5.
7. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science; 2012.
8. McKee AS, MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biol*. 2010;8:37.
9. Borghesi L, Milcarek C. Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer research*. 2007;67(9):3989-93.
10. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular + Student Consult: Elsevier Health Sciences Spain*; 2012.
11. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *IMMUNI Immunity*. 2010;33(4):492-503.
12. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114.

13. Silveira Gonzalez LF. Nuevos Adyuvantes basados en saponinas de la flora sudamericana. Montevideo: Universidad de la República; 2011.
14. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine Adjuvants: Mode of Action. *Front Immunol Frontiers in Immunology*. 2013;4.
15. Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marquês JM, Chabalgoity A, de Costa F, 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*. 2011;29(49):9177-82.
16. Nico D, Borges RM, Brando LM, Feijú DF, Gomes DC, Palatnik M, et al. The adjuvanticity of Chiococca alba saponins increases with the length and hydrophilicity of their sugar chains. *Vaccine*. 2012;30(21):3169-79.
17. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J*. 2011;19(4):197-206.
18. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *International reviews of immunology*. 2013;32(2):209-20.
19. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature medicine*. 2011;17(8):996-1002.
20. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Micro Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(7):505-17.
21. O'Hagan Dt OGSDGESA. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 2012;30(29):4341-8.
22. Seubert A, Calabro S, Santini L, Galli B, Genovese A, Valentini S, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2011;108(27):11169-74.

23. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10501-6.

24. Garçon N, Hem S, Friede M. Evolution of adjuvants across the centuries. *Vaccines*. 6th ed 2013. p. 1392.

25. Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Experimental Biology and Medicine*. 1937;37(3):509-13.

26. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001;70(6):849-60.

27. Stuart-Harris CH. Adjuvant influenza vaccines. *Bulletin of the World Health Organization*. 1969;41(3):617-21.

28. Kumar S, Jones TR, Oakley MS, Zheng H, Kuppusamy SP, Taye A, et al. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun*. 2004;72(2):949-57.

29. Tefit Jn SV. Outlining novel cellular adjuvant products for therapeutic vaccines against cancer. *Expert review of vaccines*. 2011;10(8):1207-20.

30. Toledo H, Baly A, Castro O, Resik S, Laferté J, Rolo F, et al. A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine*. 2001;19(30):4328-36.

31. Gonzalez G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol*. 2003;14(3):461-6.

32. Gonzalez G, Sanchez B, Suarez E, Beausoleil I, Perez O, Lastre M, et al. Induction of Immune Recognition of Self Epidermal Growth Factor (EGF): Effect on EGF-Biodistribution and Tumor Growth. *Vaccine Research* 1996;5(4):233-44.
33. Gonzalez G, Pardo OL, Sanchez B, Garcia JL, Beausoleil I, Maranello P, et al. Induction of Immune Recognition of Self-Epidermal Growth Factor II: Characterization of the Antibody Response and the Use of a Fusion Protein. *Vaccine Research* 1997;6(2):91-100.
34. González G, Lage A, Crombet T, Rodríguez G, García B, Cuevas A, et al. CIMAvax-EGF: A novel therapeutic vaccine for advanced lung cancer. *Biotecnología Aplicada*. 2009;26:345-8.
35. Lage A, Crombet T, Gonzalez G. Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann Med*. 2003;35(5):327-36.
36. Sparg SG, Light ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;94(2–3):219-43.
37. Hostettmann K, Marston A. Saponins. Cambridge; New York: Cambridge University Press; 1995.
38. Kim DS, Oh SR, Lee IS, Jung KY, Park JD, Kim SI, et al. Anticomplementary activity of ginseng saponins and their degradation products. *Phytochemistry*. 1998;47(3):397-9.
39. Li W, Yan XT, Sun YN, Ngan TT, Shim SH, Kim YH. Anti-Inflammatory and PPAR Transactivational Effects of Oleanane-Type Triterpenoid Saponins from the Roots of *Pulsatilla koreana*. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(4):334-40.
40. Mshvildadze V, Elias R, Faure R, Debrauwer L, Dekanosidze G, Kemertelidze E, et al. Triterpenoid saponins from berries of *Hedera colchica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001;49(6):752-4.

41. Delmas F, Di Giorgio C, Elias R, Gasquet M, Azas N, Mshvildadze V, et al. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med.* 2000;66(4):343-7.
42. Marquina S, Maldonado N, Garduno-Ramirez ML, Aranda E, Villarreal ML, Navarro V, et al. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Phytochemistry.* 2001;56(1):93-7.
43. Simoes CM, Amoros M, Girre L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytother Res.* 1999;13(4):323-8.
44. Zhao YL, Cai GM, Hong X, Shan LM, Xiao XH. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserine* L. *Phytomedicine.* 2008;15(4):253-8.
45. Villacres-Eriksson M, Behboudi S, Morgan AJ, Trinchieri G, Morein B. Immunomodulation by *Quillaja saponaria* adjuvant formulations: in vivo stimulation of interleukin 12 and its effects on the antibody response. *Cytokine.* 1997;9(2):73-82.
46. Baumann E, Stoya G, Volkner A, Richter W, Lemke C, Linss W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.* 2000;102(1):21-35.
47. Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, Yoshikawa M. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. *Vaccine.* 2003;21(17-18):2145-51.
48. Kensil CR, Kammer R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opin Investig Drugs.* 1998;7(9):1475-82.
49. Sun Y, Liu J, Yu H, Gong C. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* with less adverse reactions. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(5):584-90.

50. Morein B, Sundquist B, Hoglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 1984;308(5958):457-60.
51. Sanders MT, Brown LE, Deliyannis G, Pearse MJ. ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunology and cell biology*. 2005;83(2):119-28.
52. Fleck JD, Kauffmann C, Spilki F, Lencina CL, Roehe PM, Gosmann G. Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine*. 2006;24(49-50):7129-34.
53. Fleck J, Schwambach J, Almeida M, Yendo AA, de Costa F, Gosmann G, et al. Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of Quillaja brasiliensis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2009;45(6):715-20.
54. Martín R, Briones R. Industrial uses and sustainable supply of Quillaja saponaria (Rosaceae) saponins. *Economic Botany*. 1999;53(3):302-11.
55. WHO, PHAC. The urgent need for action. 2005. In: Preventing Chronic Diseases A Vital Investment: WHO Global Report [Internet]. [57]. Available from: http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en.
56. Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(2):117-28.
57. WHO. Global Vaccine Action Plan (GVAP) 2011-2020. 2013. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/gbd/en/.
58. Hawken J, Troy SB. Adjuvants and inactivated polio vaccine: a systematic review. *Vaccine*. 2012;30(49):6971-9.
59. de Costa F, Yendo AC, Cibulski SP, Fleck JD, Roehe PM, Spilki FR, et al. Alternative Inactivated Poliovirus Vaccines Adjuvanted with Quillaja brasiliensis

or Quil-A Saponins Are Equally Effective in Inducing Specific Immune Responses. PLoS One. 2014;9(8):e105374.

60. Sun HX, Qin F, Ye YP. Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*. Vaccine. 2005;23(48-49):5533-42.

61. Silveira F, Rossi S, Fernandez C, Gosmann G, Schenkel E, Ferreira F. Alum-type adjuvant effect of non-haemolytic saponins purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. Phytother Res. 2011;25(12):1783-8.