



Facultad de Ciencias - PEDECIBA Biología

Universidad de la República

Estudio de la respuesta inmune desencadenada por adyuvantes basados en saponinas de *Quillaja brasiliensis*.

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Lic. Mariana Rivera Patron

Orientador: Dr. Fernando Silveira

Co-orientadora: Dra. María Moreno

Tribunal evaluador:

Presidente: Dr. Gualberto González Sapienza

Vocales: Dra. Natalia Muñoz-Wolf y Dra. Gabriela Alvite

Montevideo, diciembre de 2022

Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina
Universidad de la República



A mi mamá y a la memoria de mi papá

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don’t just give up.”

Stephen Hawking

Agradecimientos

Gracias a los miembros del Tribunal y de la Comisión Académica de Seguimiento, Dres. Gualberto González, Natalia Muñoz, Gabriela Alvite y Carlos Carmona, por haber aceptado cumplir dichos roles en esta Tesis, por sus sugerencias y correcciones constructivas.

Gracias a PEDECIBA, a las mujeres y hombres que con su esfuerzo y dedicación construyen esta herramienta tan importante para la ciencia nacional.

Gracias a los organismos financiadores: a la ANII por la financiación de una beca de maestría y otra de doctorado para la realización de esta tesis, y por la financiación de proyectos en los que se enmarcó esta tesis. Gracias también a CSIC-UdelaR por la financiación de proyectos en los que se enmarcó esta tesis y por su apoyo para asistencia a cursos internacionales.

A mis tutores María y Fernando: gracias por este gran aprendizaje.

Gracias al Dr. Alejandro Chabalgoity, por haber reincidido y haberme aceptado en el Departamento que dirige, una vez más.

Gracias al Dr. Samuel Cibulski por las horas compartidas, y por compartir su conocimiento tan generosamente. Además, gracias por los ensayos HAI, por su ayuda con el ELISpot, por habernos cedido gentilmente la vacuna contra Influenza producida por Butantan, y por haberme recibido durante una pasantía super bien planificada y llevada a cabo en su laboratorio en Porto Alegre. Gracias también al Dr. Paulo Roehe y su equipo por haberme recibido en su laboratorio tan cálidamente.

Gracias al Dr. Arthur Fett-Neto y la Dra. Anna Yendo por habernos cedido gentilmente las fracciones QB80 y QB90, y por su ayuda para poder producir ambas fracciones en nuestro laboratorio.

Gracias al Dr. Fernando Ferreira y su equipo por habernos cedido gentilmente la Fb.

Gracias a la Dra. Norma Suárez por el análisis de fracciones mediante MALDI-TOF.

Gracias a la Ing. Agr. Elena Patron por habernos cedido gentilmente los propóleos, y al Dr. Mathías Moller por su asistencia para poder producir los EEP.

Gracias a la Dra. Gabriela Casanova y su equipo de la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión de Facultad de Ciencias, y al Lic. Álvaro Olivera del Depto. de Desarrollo Tecnológico del CURE por las micrografías de las nanopartículas, y su asistencia técnica al respecto.

Gracias a la Dra. Iris Miraballes por los análisis de las formulaciones mediante DLS, y por su asistencia para interpretar los datos.

Gracias a los integrantes de la UBP (actuales y pasados), en particular a la Dra. Gabriela Maggioli por habernos cedido gentilmente el antígeno *FhLAP*, y por su ayuda en el trabajo con las metacercarias y además al Dr. Carlos Carmona, Dra. Patricia Berasaín, MSc. Cecilia Salazar por su ayuda en el trabajo con *Fasciola hepatica*.

Gracias también a la Dra. Mariana Baz por compartir gentilmente su amplia experiencia con influenza, y ayudarnos a comenzar a trabajar con este virus en nuestro laboratorio.

Gracias a la Dra. Natalia Goñi por habernos cedido el virus de influenza y también la vacuna estacional contra influenza (Vaxigrip).

Gracias a la Dra. Verónica Tórtora por habernos cedido gentilmente la línea celular Vero.

A los integrantes o exintegrantes de la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química: al Dr. Gustavo Mourglia gracias por su ayuda con el kit CBA. Gracias a la Dra. Cecilia Casaravilla y su equipo por su asistencia en el trabajo con BMDCs y por habernos cedido gentilmente la línea celular J558.

Gracias a Alexandra Elbakyan y su proyecto Sci-Hub, gracias al cual podemos acceder a la bibliografía científica.

Gracias a todas y todos los integrantes y exintegrantes del Departamento de Desarrollo Biotecnológico, especialmente a Bruno, por ser mi referente con la estadística, y a las DIVIs, por tanto!

Gracias a mis amigas, amigos y a mi familia por su apoyo, confianza y su cariño.

(Sin dudas *“it takes a village...”*!)

A ellos y ellas: Muchas gracias!

Índice	
Agradecimientos.....	1
Resumen.....	7
Abreviaturas.....	9
Lista de Figuras.....	14
Lista de Tablas.....	16
1. Introducción.....	17
1.1. Vacunas.....	17
1.1.1. <u>Desarrollo de Vacunas</u>	18
1.1.2. <u>Cómo funcionan las vacunas</u>	20
1.2. Adyuvantes de vacunas.....	26
1.2.1. <u>Desarrollo de los adyuvantes</u>	26
1.2.2. <u>Principales adyuvantes & mecanismos de acción</u>	31
1.2.2.1. <u>Sales de aluminio</u>	31
1.2.2.2. <u>Emulsiones</u>	32
1.2.2.3. <u>Agonistas de PRRs</u>	33
1.2.2.4. <u>Activación del inflamasoma</u>	35
1.3. Saponinas.....	36
1.3.1. <u>Saponinas de <i>Quillaja saponaria</i></u>	36
1.3.2. <u>Saponinas de <i>Quillaja brasiliensis</i></u>	39
1.3.3. <u>Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs)</u>	41
1.3.4. <u>Mecanismo de acción de adyuvantes basados en saponinas (SBAs)</u>	43
1.4. Propóleos de <i>Apis mellifera</i>.....	45
1.5. Modelos infecciosos.....	46
1.5.1. <u><i>Fasciola hepatica</i></u>	46
1.5.2. <u>Influenza</u>	51
2. Objetivos.....	56
3. Materiales y métodos.....	57
3.1. Obtención de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> y extracto acuoso de propóleos.....	57
3.1.1. <u>Obtención de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i></u>	57
3.1.2. <u>Obtención de extractos etanólicos de propóleos</u>	58
3.2. Adyuvante comercial utilizado.....	58
3.3. Antígenos.....	58
3.3.1. <u>Antígeno modelo (OVA)</u>	58
3.3.2. <u>Antígeno reportero (DQ-OVA)</u>	58
3.3.3. <u>Antígeno recombinante parasitario (<i>Fasciola hepatica</i>)</u>	58
3.3.4. <u>Antígeno viral (influenza)</u>	59
3.4. Formulación de adyuvantes nanoparticulados.....	59
3.4.1. <u>Formulación de ISCOMs e ISCOMATRIX por inyección rápida de etanol</u>	59

3.4.2.	<u>Formulación de ISCOMs e ISCOMATRIX por el método de diálisis</u>	60
3.4.3.	<u>Diseño y formulación de ISCOMPros e IMXPros</u>	60
3.5.	Caracterización de formulaciones	60
3.5.1.	<u>Caracterización de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> por MALDI-TOF</u>	60
3.5.2.	<u>Caracterización de extractos de propóleos</u>	61
3.5.2.1.	<u>Determinación relativa del contenido de polifenoles totales en EEP</u>	61
3.5.2.2.	<u>Determinación de Flavonoides en EEP</u>	61
3.5.3.	<u>Visualización de nanoformulaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)</u>	61
3.5.3.1.	<u>MET</u>	61
3.5.3.2.	<u>MET de alta resolución (HR-MET)</u>	62
3.5.4.	<u>Determinación de la dispersión dinámica de la luz de las nanoformulaciones</u>	62
3.6.	Líneas celulares y cultivos celulares primarios utilizados	62
3.6.1.	<u>Células Vero</u>	62
3.6.2.	<u>Células MDCK</u>	63
3.6.3.	<u>Células J558</u>	63
3.6.4.	<u>Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)</u>	63
3.6.5.	<u>Obtención de esplenocitos murinos</u>	65
3.6.6.	<u>Células de ganglio drenante (dLN) murino</u>	65
3.6.7.	<u>Células J774 A.1</u>	65
3.6.8.	<u>Líneas celulares reporteras</u>	65
3.6.8.1.	<u>Células THP1-XBlue™</u>	66
3.6.8.2.	<u>Células THP1-XBlue™-defMyD</u>	66
3.6.8.3.	<u>Células RAW-Blue™</u>	66
3.7.	Animales de experimentación	67
3.7.1.	<u>CD1</u>	67
3.7.2.	<u>BALB/c y C57Bl/6J</u>	67
3.7.3.	<u>C57Bl/6 Casp 1/11 knock-out y littermates</u>	67
3.8.	Ensayos de toxicidad	68
3.8.1.	<u>Toxicidad <i>in vitro</i>: hemólisis</u>	68
3.8.2.	<u>Toxicidad <i>in vitro</i>: ensayo de MTT</u>	68
3.8.3.	<u>Toxicidad <i>in vivo</i>: ensayos de toxicidad aguda</u>	69
3.8.3.1.	<u>Toxicidad aguda de fracciones de saponinas</u>	69
3.8.3.2.	<u>Toxicidad aguda de nanoformulaciones</u>	69
3.9.	Estudio de la respuesta inmune innata	69
3.9.1.	<u>Reclutamiento celular a tiempos tempranos</u>	69
3.9.2.	<u>Activación de macrófagos y BMDCs por citometría de flujo</u>	71
3.9.3.	<u>Producción de óxido nítrico en macrófagos</u>	72
3.9.4.	<u>Determinación de la concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivos</u>	73
3.9.5.	<u>Estudio de internalización y procesamiento de antígeno</u>	73
3.9.6.	<u>Interacción de formulaciones con receptores de la inmunidad innata</u>	74
3.9.7.	<u>Estudio de la activación del inflammasoma en células dendríticas</u>	74
3.10.	Estudio de la respuesta inmune adaptativa y de la protección conferida por SBAs de <i>Q. brasiliensis</i>	75
3.10.1.	<u>Ensayo de vacunación con antígeno parasitario</u>	75

3.10.2. <u>Ensayo de vacunación y desafío con antígeno parasitario</u>	76
3.10.3. <u>Ensayos de vacunación con antígeno viral de Influenza</u>	77
3.10.4. <u>Desafío con el virus de influenza</u>	77
3.10.5. <u>Determinación de la carga viral en pulmón</u>	79
3.10.6. <u>Evaluación de la respuesta humoral</u>	79
3.10.6.1. <u>Determinación niveles de anticuerpos mediante ELISA</u>	79
3.10.6.2. <u>Frecuencia de células B secretoras de anticuerpos específicos mediante ELISpot</u>	79
3.10.6.3. <u>Determinación de títulos HAI</u>	80
3.10.7. <u>Evaluación de la respuesta celular</u>	80
3.10.7.1. <u>Ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH)</u>	80
3.10.7.2. <u>Linfoproliferación</u>	81
3.10.7.3. <u>Producción de citoquinas</u>	81
3.11. Análisis estadístico	81
4. Resultados y Discusión	82
4.1. Capítulo 1: Obtención de fracciones de saponinas, EEP y nanoformulaciones	82
4.1.1. <u>Obtención de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i></u>	82
4.1.2. <u>Caracterización de las fracciones de saponinas</u>	83
4.1.3. <u>Obtención y caracterización fisicoquímica de extractos etanólicos de propóleos (EEP)</u>	86
4.1.4. <u>Nanoformulaciones: visualización por MET y DLS</u>	86
4.1.5. <u>Toxicidad <i>in vitro</i></u>	94
4.1.6. <u>Toxicidad <i>in vivo</i></u>	96
4.2. Capítulo 2: Efecto de los SBAs sobre la inmunidad innata	99
4.2.1. <u>Reclutamiento en bazo y dLN a tiempos tempranos (6 y 24 hs post inoculación)</u>	99
4.2.2. <u>Activación y “funcionalidad” de APCs</u>	109
4.2.2.1. <u>Activación funcionalidad de macrófagos</u>	110
4.2.2.2. <u>Expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs</u>	111
4.2.2.3. <u>Internalización y procesamiento de antígeno por parte de BMDCs</u>	112
4.2.3. <u>Interacción de los SBAs con PRRs y MyD88</u>	116
4.2.4. <u>Producción de IL-1β dependiente de Casp1/11 y rol en la activación del inflammasoma</u>	117
4.3. Capítulo 3: Efecto de los SBAs sobre la inmunidad adaptativa	121
4.3.1. <u>Inmunidad adaptativa frente a un antígeno parasitario</u>	121
4.3.1.1. <u>Respuesta inmune humoral frente a un antígeno parasitario</u>	121
4.3.1.2. <u>Respuesta inmune celular frente al antígeno parasitario FhLAP</u>	125
4.3.1.3. <u>Protección frente al parásito <i>F. hepatica</i></u>	129
4.3.2. <u>Inmunidad adaptativa frente a un antígeno viral</u>	137
4.3.2.1. <u>Respuesta humoral y celular frente al antígeno viral de influenza</u>	137
4.3.2.2. <u>Evaluación del efecto dose-sparing en el modelo de influenza</u>	144
4.3.2.3. <u>Respuesta humoral y protección frente al desafío mediante la inoculación intranasal de IQB90-Flu</u>	149
4.3.2.4. <u>Protección frente al desafío letal con el virus de influenza</u>	152

4.3.2.5. Rol de Casp 1/11 en la respuesta innata frente a influenza.....	159
4.3.2.6. Inmunidad frente a influenza a largo plazo.....	162
5. Conclusiones & Perspectivas.....	167
6. Referencias.....	171
7. Anexos.....	195
7.1. Artículos publicados a partir de esta Tesis.....	195
7.2. Capítulo de libro publicado a partir de esta Tesis.....	195

Resumen

Los adyuvantes son componentes fundamentales para lograr vacunas seguras y eficaces, aunque pocos de ellos inducen respuestas tipo Th1, necesarias para combatir patógenos intracelulares y cáncer. Las saponinas, particularmente las obtenidas del árbol chileno *Quillaja saponaria*, se incluyen como adyuvantes en vacunas veterinarias y humanas. Debido a su toxicidad, se utilizan formuladas en complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), manteniendo su capacidad inmunoestimulante y evitando sus efectos nocivos. Nuestro grupo reportó por primera vez la formulación de ISCOMs con saponinas obtenidas de extractos foliares del árbol nativo *Q. brasiliensis*, y demostró su capacidad adyuvante frente a distintos antígenos virales, caracterizada por una potente respuesta tipo Th1 y producción de anticuerpos con potencial neutralizante. Dado que una limitante que presentan la mayoría de los adyuvantes, incluidos los adyuvantes basados en saponinas (SBAs) es que a pesar de desencadenar potentes respuestas inmunológicas, no se conoce su mecanismo de acción. Poder elucidar el mecanismo de acción es crucial para poder entender cómo optimizar su uso y como combinarlos con los diferentes antígenos para lograr desencadenar respuestas inmunes potentes, pero sobre todo efectivas y duraderas. Por esta razón nos propusimos caracterizar la respuesta inmune desencadenada por los SBAs de *Q. brasiliensis*, tanto a nivel del sistema inmune innato (SII) como adaptativo (SIA). Para ello, produjimos fracciones de saponinas a partir de extractos foliares de *Q. brasiliensis*, con ellas logramos formular nanopartículas (NPs) tipo ISCOMs (con antígeno incorporado) o ISCOMATRIX (IMX, sin antígeno incorporado), mediante el método de inyección rápida de etanol, y mediante diálisis. Además, diseñamos un nuevo sistema de adyuvantes, que consiste en la combinación de saponinas de *Q. brasiliensis* con extractos etanólicos de propóleos (EEP) producidos por las abejas *Apis mellifera*, y al que hemos denominado ISCOMPro (o IMXPro en ausencia de antígeno). Al evaluar las nanoformulaciones por microscopía electrónica de transmisión (MET) y mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), se evidenció que las mismas eran de tamaño y forma adecuadas: aproximadamente de 40 nm y de forma tipo caja. Una vez obtenidas las formulaciones, evaluamos cómo estos adyuvantes activan el SII. En este sentido, demostramos que las saponinas de *Q. brasiliensis* tanto en forma soluble como en NPs tipo IMX logran el reclutamiento de granulocitos y linfocitos al ganglio drenante (dLN) y al bazo a tiempos tempranos (6 y 24 horas post inoculación). Particularmente en este trabajo se estudió por primera vez el efecto de los SBAs de *Q. brasiliensis* sobre la subpoblación de macrófagos CD169⁺ en dLN y bazo. Estos macrófagos residentes del dLN jugarían un rol preponderante en la capacidad adyuvante de QS-21, una saponina comercial ampliamente utilizada. Respecto a la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno (APC) al ser estimuladas *in vitro* con los SBAs de *Q. brasiliensis*, se evidenció que los macrófagos murinos de la línea celular J774 A.1 producían óxido nítrico, sugiriendo su activación hacia el fenotipo proinflamatorio M1. Además, evidenciamos la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las APC cuando eran estimuladas con los SBAs de *Q. brasiliensis*, e identificamos que éstos son capaces de inducir la producción de IL-1 β en presencia de un agonista de TLRs, de una manera dependiente de Caspasa 1/11, indicando que estos adyuvantes promoverían la formación del complejo inflamasoma, al igual que se ha descrito para otros adyuvantes particulados, y para la saponina comercial QS-21.

Dado que una buena estimulación del SII condiciona las características de la respuesta adaptativa, evaluamos la respuesta antígeno-específica a corto y largo plazo. Para ello, trabajamos en el modelo de ratón con 2 antígenos muy diferentes: un antígeno parasitario de *Fasciola hepatica*, y un antígeno viral de Influenza. En ambos casos se logró evidenciar una

potente respuesta inmune antígeno-específica tanto humoral como celular, y además al realizar ensayos de desafío, se logró demostrar que las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* conferían una mejor protección frente a la infección que las formulaciones sin adyuvante y comparable a la inducida por las saponinas comerciales. Además, en el caso de Influenza se evidenció que estos adyuvantes son buenos inductores de la inmunidad de mucosas de las vías respiratorias, y que la capacidad adyuvante de los SBAs de *Q. brasiliensis* se mantiene independientemente de la cepa, sexo y edad de los ratones. Asimismo, se evidenció que la respuesta desencadenada es duradera en el tiempo (60 días).

Los contundentes resultados obtenidos permiten inferir que estos adyuvantes podrían ser utilizados en combinación con una amplia gama de antígenos, tanto para salud animal como para salud humana, gracias a su potencial para desencadenar una respuesta inmune efectiva y duradera en el tiempo. Estos resultados permitirán avanzar en la caracterización de los mecanismos de acción de estos novedosos adyuvantes, aunque su caracterización podría estudiarse también mediante herramientas más poderosas, como las tecnologías ómicas.

Abreviaturas

AE:	Extracto acuoso (del inglés <i>aqueous extract</i>)
AM:	Macrófagos alveolares
AP-1:	proteína activadora 1 (factor de transcripción)
APC:	Célula presentadora de antígeno profesional
AS:	Sistema de adyuvantes (del inglés <i>Adjuvant System</i>)
ASC:	Células secretoras de anticuerpos (del inglés <i>Antibody-secreting cells</i>)
AU:	unidades arbitrarias (del inglés <i>arbitrary units</i>)
BCG:	Bacilo de Calmette y Guérin
BMDC:	Células Dendríticas derivadas de Médula Ósea (del inglés <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>)
bp:	pares de bases (del inglés <i>base pairs</i>)
BSA:	seroalbúmina bovina
Casp 1/11:	Caspasa 1 y Caspasa 11
CCL:	ligandos de quemoquinas (del inglés <i>chemokine ligands</i>)
CD:	cluster de diferenciación
CEUA:	Comisión de Evaluación del Uso de Animales
CFA:	Adyuvante completo de Freund
CFSE:	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHEA:	Comisión de Honoraria de Experimentación Animal (Udelar)
CMI:	Inmunidad mediada por células (del inglés <i>Cellular Mediated Immunity</i>)
CNEA:	Comisión Nacional de Experimentación Animal
CO ₂ :	dióxido de carbono
ConA:	Concanavalina A
CPE:	efecto citopático
CTL:	Linfocitos T citotóxicos
CURE:	Centro Universitario Regional Este
DAMPs:	Patrones moleculares asociados a daño
DCs:	Células dendríticas
dLNs:	ganglios linfáticos drenantes (del inglés <i>draining lymph nodes</i>)
DLS:	Dispersión dinámica de la luz (del inglés <i>dynamic light scattering</i>)
DMEM:	del inglés <i>Dulbecco modified Eagles minimal essential medium</i>

dpd: días post-desafío

DQ-OVA: OVA conjugada a sonda DQ.

DTH: Ensayo de hipersensibilidad retardada (del inglés *Delayed-Type Hypersensitivity assay*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEP: Extracto etanólico de propóleos

Fb: Fracción b de saponinas de *Quillaja brasiliensis*

FC: Reactivo de Folin-Ciocalteu

FhLAP: leucinaminopeptidasa de *Fasciola hepatica*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Flu: antígeno de influenza

FSC: *forward scatter*

fTh: Célula T colaboradora folicular (del inglés *follicular T helper*)

GAE: Equivalentes de ácido gálico

GLP: Buenas prácticas de laboratorio (del inglés *Good Laboratory Practices*)

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GMP: Buenas prácticas de manufactura (del inglés *Good Manufacturing Practices*)

H1N1: Hemaglutinina 1 Neuraminidasa 1

HA: Hemaglutinina (de Influenza)

HAI: Inhibición de la hemaglutinación (del inglés *Hemagglutination Inhibition*)

HD₅₀: Dosis hemolítica 50. Dosis capaz de lisis el 50 % de los RBC

hi: inactivado por calor (del inglés *heat-inactivated*)

HR-MET: microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

i/d: intradérmica

i/n: intranasal

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: interleuquina

IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*,

IMX: ISCOMATRIX

IPTP: Instituto Polo Tecnológico de Pando

ISCOMs: Complejos inmunoestimulantes

ISCOMATRIX: Complejos inmunoestimulantes-matrices (sin antígeno)

ISCOMPro: Complejos inmunoestimulantes con EEP

IMXPro: Complejos inmunoestimulantes-matrices (sin antígeno) con EEP

kDa: Kilo daltons

ko: *knock-out*

kV: kilo voltios

g: gramos

L: litros

LB: cuerpos lipídicos (del inglés *lipid bodies*)

LLPCs: Células plasmáticas de larga vida (del inglés *Long Lived Plasma Cells*)

LPS: lipopolisacáridos

m: metros

M: molar

MALDI-TOF-MS:

MDCK: Las células de riñón canino de Madin-Darby

MDP: Muramil dipéptido

MET: microscopía electrónica de transmisión

MFI: Media de la intensidad de fluorescencia (del inglés *Mean of Fluorescence Intensity*)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility Complex*)

µg: microgramos

µL: microlitros

µm: micrómetros

mg: miligramos

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

µM: micromolar

MSP: Ministerio de Salud Pública, Uruguay.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium

MyD88: Diferenciación mieloide 88

N: normal

NA: Neuraminidasa (de Influenza)

NEDA: N-(1-naftil)-etilendiamina

NEJ: Juveniles recientemente desenquistados de *Fasciola hepatica* (del inglés *Newly Excysted Juveniles*)

NF- κ B: Factor Nuclear *kappa* B

NK: Células *Natural killer*

NLR: Receptores tipo NOD

NLRP3: del inglés *NLR family pyrin domain containing 3*

nm: nanómetros

NO: óxido nítrico

NPs: nanopartículas

OD: Densidad óptica (del inglés *optical density*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: del inglés *overnight*, toda la noche.

OPD: Orto-fenilenediamina (del inglés *ortho-phenylenediamine*)

OVA: ovoalbúmina

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBST: PBS 0,05 % de Tween20® (Sigma)

PE: ficoeritrina

pI: punto isoeléctrico

PDI: índice de polidispersidad

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

PTA: ácido fosfotúngstico

QB80: Fracción QB80 de saponinas de *Quillaja brasiliensis*

QB90: Fracción QB90 de saponinas de *Quillaja brasiliensis*

RBC: eritrocitos (del inglés *Red Blood Cells*)

RIG: Gen inducible del ácido retinoico

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute (del inglés *Roswell Park Memorial Institute medium*)

s/c: subcutánea

SBA: adyuvantes basados en saponinas (del inglés *Saponin Based Adjuvants*)

SBF: Suero Fetal Bovino

SEAP: fosfatasa alcalina embrional secretada (del inglés *secreted embryonic alkaline phosphatase*)

SEM: Error estándar asociado a la media (del inglés *Standard Error of the Mean*)

SSC: *side scatter*

TCID₅₀/mL: Media de la dosis infectante de tejido por mL (del inglés *Median Tissue Culture Infectious Dose*)

TFA: ácido trifluoroacético

Th: Célula T *helper* (colaboradora)

TLRs: Receptores Tipo Toll (del inglés *Toll-Like Receptors*)

TPCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone

TSIV: Vacuna trivalente fragmentada e inactivada (del inglés *Trivalent Split Inactivated Vaccine*)

UA: unidades arbitrarias

UI: Unidades internacionales

wt: *wild type*

ZP: Potencial zeta

Lista de Figuras

Sección	Nº Figura	Título de Figura	Página
Introducción	1	Generación de la respuesta inmune adaptativa frente a las vacunas.	24
	2	Tipos de plataformas vacunales.	25
	3	Gastón Ramón en su laboratorio.	27
	4	Interacción de los adyuvantes con los distintos PRRs.	34
	5	Activación de complejos inflamasomas por parte de los adyuvantes	35
	6	Fotos de <i>Quillaja saponaria</i> .	37
	7	Estructura química de QS-21.	39
	8	Fotos de <i>Quillaja brasiliensis</i> .	40
	9	Estructura química de S13, una saponina obtenida de <i>Q. brasiliensis</i> .	41
	10	Estructura de los ISCOMs.	42
	11	Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .	48
	12	Mecanismo de invasión y establecimiento de <i>F. hepatica</i> en el hospedero definitivo	49
	13	Influenza: esquema del virus y de la infección a una célula epitelial.	52
Materiales y métodos	14	Fenotipificación de BMDCs por citometría de flujo	64
	15	Estrategia de gating para inmunofenotipificación de linfocitos por citometría de flujo.	70
	16	Estrategia de gating para inmunofenotipificación de granulocitos por citometría de flujo.	71
	17	Estrategia de gating para evaluación de expresión de moléculas co-estimuladoras.	72
Resultados y discusión	18	Caracterización de las fracciones QB80 y QB90 mediante MALDI-TOF	85
	19	Visualización de nanopartículas tipo ISCOM o ISCOMATRIX mediante MET o HR-MET.	90
	20	Determinación de HD50 de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> .	95
	21	Citotoxicidad de las fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> o sus IMX.	96
	22	Evaluación de toxicidad in vivo de fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> .	98
	23	Poblaciones celulares reclutadas en bazo y dLN a 6 y 24 horas post inoculación.	101
	24	Reclutamiento de granulocitos en dLN 6 y 24 horas post inoculación.	103
	25	Reclutamiento de granulocitos en bazo 6 y 24 horas post inoculación.	104
	26	Reclutamiento de linfocitos en dLN 6 y 24 horas post inoculación.	106
	27	Reclutamiento de linfocitos en bazo 6 y 24 horas post inoculación.	108
	28	Expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos J774 A.1.	110
	29	Concentración de citoquinas y óxido nítrico en sobrenadante de macrófagos murinos J774 A.1 estimulados con SBAs.	111
	30	Expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs	112
	31	Porcentaje de BMDCs murinas que internalizan y procesan el antígeno DQ-OVA luego de 24 horas a 37 °C.	113
	32	Internalización y procesamiento de antígeno por BMDCs murinas: intensidad de fluorescencia.	114
	33	Concentración de citoquinas en sobrenadante de BMDCs murinas estimuladas con IMXQB90 y DQ-OVA	115
	34	Células reporteras estimuladas con SBAs de <i>Q. brasiliensis</i> .	117

Sección	Nº Figura	Título de Figura	Página
	35	Producción de IL-1 β en BMDCs murinas estimuladas con QB90 o IMXQB90.	119
	36	Ensayo de vacunación con <i>Fh</i> LAP y niveles de anticuerpos IgGTotal.	122
	37	Perfil de la respuesta humoral desencadenada en el ensayo de vacunación con <i>Fh</i> LAP.	124
	38	Respuesta celular frente a la vacunación.	126
	39	Citoquinas secretadas por esplenocitos.	128
	40	Ensayo de vacunación y desafío con <i>F. hepatica</i> : esquema de vacunación y niveles de anticuerpos IgGTotal.	131
	41	Perfil de la respuesta humoral y respuesta celular desencadenada en el ensayo de vacunación y desafío contra <i>F. hepatica</i> .	133
	42	Ensayo de desafío con <i>F. hepatica</i> .	134
	43	Ensayo de desafío con <i>F. hepatica</i> : necropsia a tiempo final, 45 días post desafío (dpd).	135
	44	Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza.	138
	45	Caracterización de la respuesta inmune en ensayo de vacunación s/c contra influenza.	141
	46	Linfoproliferación y secreción de citoquinas en sobrenadante de esplenocitos de ratones vacunados contra influenza.	143
	47	Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza y evaluación del efecto <i>dose-sparing</i> .	145
	48	Perfil de la respuesta humoral, funcionalidad de anticuerpos y evolución del peso corporal frente al desafío subletal con influenza en la evaluación del efecto <i>dose-sparing</i> .	148
	49	Ensayo de vacunación intranasal contra influenza A.	149
	50	Perfil de la respuesta humoral, funcionalidad de anticuerpos y evolución del peso corporal frente al desafío subletal con influenza en la evaluación de la inoculación intranasal.	151
	51	Protección conferida por formulaciones conteniendo saponinas nativas frente al desafío letal de influenza.	153
	52	Respuesta humoral de ratones vacunados por vía s/c contra influenza al d28 previo al desafío.	155
	53	Protección conferida por formulaciones conteniendo saponinas nativas frente a desafío letal de influenza en según el sexo, edad y cepa de los ratones.	158
	54	Respuesta humoral y celular en ratones wt y ko para Casp 1/11 inoculados con IQB90-Flu.	161
	55	Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza a largo plazo.	163
	56	Respuesta celular específica contra influenza a largo plazo.	164
	57	Respuesta de células T de memoria a largo plazo.	165

Lista de Tablas

Sección	Nº Tabla	Título de Tabla	Página
Introducción	1	Lista de los principales adyuvantes incluidos en vacunas ya licenciadas, o en vacunas en ensayos clínicos.	30
Materiales y Métodos	2	Paneles utilizados para inmunofenotipificación de células reclutadas en bazo y dLN a tiempos tempranos.	70
	3	Kits utilizados para la determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos estimulados con SBAs.	73
	4	Ensayos de vacunación y protección en ratones realizados con el antígeno de influenza.	78
Resultados y discusión	5	Fuente de obtención de las distintas fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i> y ensayos en que se utilizaron.	82
	6	Análisis de nanoformulaciones mediante DLS.	93

1. Introducción

1.1. Vacunas

Una vacuna es un producto biológico que es utilizado para promover de manera segura una respuesta inmune capaz de conferir protección contra la infección o enfermedad en la exposición subsiguiente al agente causal de ésta. Para lograrlo, las vacunas contienen antígenos que representan componentes del patógeno. Estos antígenos pueden ser derivados del patógeno o producidos sintéticamente. Las vacunas profilácticas son aquellas que tienen como objetivo proteger a los individuos de las enfermedades. Se administran a individuos sanos para prevenir o reducir los efectos de una futura infección por un patógeno, o para prevenir que se establezca una infección en el futuro. Por otro lado, las vacunas terapéuticas tienen como objetivo tratar una enfermedad ya existente en un individuo dado, y se administran para tratar o reducir los efectos de una enfermedad ya existente¹.

Los términos “vacuna” y “vacunación” derivan de *Variolae vaccinae*, término con el cual Edward Jenner designó a la varicela vacuna (*cowpox*) en 1796, en el título del trabajo en el que describía los efectos protectivos de ésta frente a la viruela (en humanos). En 1881, Louis Pasteur propuso que se extendiera el término “vacuna” a todas las formulaciones protectivas que se desarrollaran, en honor a Jenner².

Las vacunas han revolucionado la salud durante el siglo XX, ya que han sido una de las estrategias más costo-efectivas para disminuir la tasa de morbilidad por enfermedades infecciosas a lo largo de la historia. Luego de la implementación del agua potable, se cree que son el invento que ha salvado más vidas en la historia de la humanidad³. Sin embargo, las enfermedades infecciosas aún afectan muchas vidas humanas y animales, debido a que aún no se ha logrado alcanzar el máximo potencial de las vacunas, por varias razones. En primer lugar, aún no se ha logrado que las vacunas efectivas estén disponibles para la población de todos los países, principalmente en los países subdesarrollados. La Alianza Mundial para las Vacunas e Inmunizaciones (GAVI, por sus siglas en inglés de *Global Alliance for Vaccines and Immunizations*) estima que más de 1,5 millones de personas, incluyendo 600.000 niños menores de 5 años, mueren por año de enfermedades prevenibles por vacunación^{4,5}. Además, a pesar de los avances en el desarrollo biotecnológico, aún no se ha logrado desarrollar vacunas efectivas contra muchos agentes infecciosos, incluyendo entre otros a el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), *Mycobacterium tuberculosis*, y *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, agentes causales de la malaria, que provocan más de 5 millones de muertes en todo el mundo anualmente^{6,7}. Por último, y no menos importante, la reciente pandemia de SARS-CoV-2 ha dejado claro que debemos estar preparados para la ocurrencia de epidemias o pandemias resultantes del salto de especie (*spillover*) de los patógenos, favorecido en gran parte por las prácticas humanas en continua interacción con distintos ecosistemas y fauna. Por ello, es fundamental entender que el desarrollo de vacunas es dinámico y debe encararse con un enfoque de *One health*, es decir considerando la salud humana, animal y del ecosistema como Una Salud⁸. Además, entender los mecanismos inmunológicos que subyacen a la protección frente a distintos patógenos que afectan a humanos o animales, así como establecer correlatos de protección que permitan optimizar los tiempos de evaluación de nuevas vacunas o inmunoterapias, es crucial para lograr el desarrollo de nuevas vacunas seguras y eficaces⁹.

Los objetivos de la vacunación son: lograr la protección del individuo vacunado y lograr la protección colectiva mediante la inmunidad de rebaño, limitando la circulación del patógeno, y en consecuencia, disminuyendo el riesgo de infección de los individuos no vacunados. Vacunarse significa decidir tomar “un tratamiento” sin estar enfermo, y sin tener certeza de si sería necesario. Dado que todo tipo de tratamiento tiene riesgos asociados, la decisión de la vacunación debe hacerse basándose en un análisis de riesgo/beneficio, que demuestra que el beneficio que se obtiene de la vacunación sobrepasa el riesgo que trae asociado. Este análisis es muy fácil de hacer cuando se tiene la amenaza muy cercana de contraer una enfermedad grave. Sin embargo, cuando la incidencia de la enfermedad es muy baja (muchas veces debido justamente a la implementación de exitosos planes de vacunación), puede ocurrir a escepticismo respecto a las vacunas en la población, también conocido como "vacilación frente a las vacunas" ("*vaccine hesitancy*" en inglés). Estas dudas respecto al funcionamiento de las vacunas han ocurrido desde los principios de la vacunación, con los primeros experimentos de Jenner en el siglo XVIII. Sin embargo, hoy en día hay mucho más conocimiento sobre el funcionamiento de las vacunas de lo que había en la época de Jenner, y aun así hay grupos de personas organizadas como anti-vacunas, con conceptos equivocados o desinformación, que ponen en riesgo los planes de vacunación, disminuyendo la cobertura vacunal que puede desencadenar en la pérdida de la inmunidad de rebaño, dejando expuestos a individuos que por diferentes razones no pueden vacunarse o no responden a la vacunación¹⁰.

1.1.1. Desarrollo de Vacunas

Aunque se tiene indicios de que en oriente en la antigüedad se realizaba la variolización, se considera que los esfuerzos de Lady Mary Wortley Montagu, la esposa de un diplomático inglés, por introducir los métodos de variolización en Inglaterra para prevenir la viruela, fue crucial en la historia de la vacunación. Luego, el experimento realizado también en Inglaterra por Edward Jenner en 1796 es un hito de la inmunología, ya que demostró que la inoculación con pus de lesiones de viruela vacuna (cowpox), confería protección a las personas frente a la infección de viruela humana (smallpox), contribuyendo de esta manera a entender el concepto de "inmunización", y a la posterior erradicación de la viruela, dos siglos después. La viruela era una de las enfermedades humanas más severas y provocaba, solo en Europa, la muerte de más de 400.000 personas por año. En 1979, luego de un arduo trabajo de coordinación mundial para la inmunización de la población, se logró la erradicación de la enfermedad. El trabajo de Jenner fue continuado y refinado casi un siglo después por el francés Louis Pasteur, que logró atenuar microorganismos en su laboratorio, y en 1885 desarrolló la primera vacuna contra la rabia para humanos. El trabajo de Pasteur significó un gran avance en la comprensión, la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas, ya que estableció las bases de la formulación de vacunas, es decir, el principio de aislamiento, inactivación y administración de patógenos que previo a la inactivación causaban enfermedad. Los principios de Pasteur permitieron el desarrollo de lo que hoy conocemos como "vacunas de primera generación", que están basadas en microorganismos enteros, ya sea muertos/inactivados o vivos y atenuados (la vacuna celular de *Bordetella pertussis* o el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) contra la tos convulsa y la tuberculosis respectivamente, entre otros ejemplos)¹¹.

En la segunda mitad del siglo XX, las innovaciones y las nuevas tecnologías que permitieron el cultivo de líneas celulares de mamífero dieron lugar a las vacunas "de segunda generación", tales como polio (vacuna oral de Sabin), sarampión, rubeola, paperas y varicela. Más recientemente, el uso continuo de la vacuna de la polio atenuada (vacuna de Sabin) implementada en planes de vacunación mundial, ha permitido disminuir drásticamente la incidencia de la polio, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha propuesto estrategias para lograr la erradicación de esta enfermedad. Aunque las vacunas desarrolladas en el último siglo han sido de incuestionable valor, ya que se estima que han evitado más de 700 millones de enfermedades y más de 150 millones de muertes¹², los métodos convencionales de diseño de vacunas tienen varias limitaciones. Por ejemplo, no se pueden utilizar para desarrollar vacunas contra microorganismos que no sean cultivables *in vitro* (por ejemplo: *Mycobacterium leper*, virus del papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18, entre otros). No confieren protección frente a patógenos con hipervariabilidad antigénica (tales como *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, VIH, Virus de la Hepatitis C), o contra patógenos con fase intracelular y/o ciclos complejos, que causan infecciones que deben ser controladas por células T, como es el caso de los agentes causales de tuberculosis o malaria. Por último, el enfoque tradicional del desarrollo de vacunas es muy lento y consume mucho tiempo, impidiendo lograr respuestas rápidas frente a la necesidad de una nueva vacuna, por ejemplo, en el caso de una pandemia. Para superar todas estas limitaciones, durante los últimos 30 años, se han aplicado nuevas biotecnologías al desarrollo de vacunas, tales como el ADN recombinante, la química de polisacáridos y la conjugación de éstos a proteínas, vacunología reversa, vacunología estructural, y más recientemente vacunas a ARN mensajero (ARNm), que mostraron un rápido desarrollo durante la pandemia de SARS-CoV-2. Estas tecnologías, han permitido diseñar y desarrollar vacunas "de tercera generación", que no solo logran conferir protección contra patógenos contra los que no era posible desarrollar vacunas con las tecnologías previas, sino que además, se basan en el diseño racional de vacunas¹³. Dado que las vacunas se aplican masivamente a individuos sanos, es crucial evitar posibles efectos adversos. Por ello, se requiere por un lado la comprensión de los mecanismos del sistema inmune que confieren protección, y por ende la identificación de correlatos de protección, y por el otro el conocimiento de los componentes de las vacunas, así como también su mecanismo de acción^{14,15}.

Por esta misma razón, el desarrollo de vacunas involucra distintas etapas estrictamente reguladas, desde su concepción y desarrollo hasta su aprobación para ser administradas en la población. Para pasar de una etapa a la siguiente, se debe haber culminado la etapa previa con éxito, y se debe contar con la aprobación de los organismos regulatorios correspondientes para iniciar la siguiente. Bajo ningún concepto se puede alterar el orden de estas etapas. En estas se debe probar la formulación completa, incluyendo todos los componentes (que en general incluyen antígeno, excipientes, solvente y adyuvantes si los tuviera), y una vez que se aprueba una formulación, no implica que los componentes por separado estén aprobados para su uso, sino que lo que se aprueba son los componentes en esa formulación específica¹⁶.

La primera etapa en el desarrollo de una vacuna es la *etapa de descubrimiento*. Esta etapa surge a partir de una necesidad epidemiológica, y en ella se exploran diferentes estrategias a nivel de laboratorio de investigación y desarrollo. El objetivo de esta etapa es producir en pequeña escala una vacuna "prototipo" y demostrar que funciona, es decir, es inmunogénica y segura en un modelo animal. Una vez culminada esta fase, comienzan los *estudios pre-clínicos*. Para

realizarlos se debe lograr el escalado del producto para obtener lotes de producción a granel en condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP), y luego se deben obtener 3 lotes consecutivos del producto que serán evaluados en distintas especies de animales, en general mamíferos incluyendo primates no humanos. Con estos se realizan exhaustivos ensayos de inmunogenicidad, y también de reactogenicidad o toxicidad local y sistémica, así como también de teratogenicidad. Culminada esta etapa, el producto puede comenzar los *ensayos clínicos*, que se dividen en 4 fases. Para realizar estos ensayos se requiere el reclutamiento de personas voluntarias que deben firmar un consentimiento informado sobre su participación en el ensayo, así como también comprometerse a acudir a las distintas instancias para toma de muestra y monitoreo de su estado de salud por parte del equipo médico a cargo de realizar el ensayo. Los voluntarios, además, son elegidos por cumplir ciertos requisitos definidos por el equipo técnico a cargo de la realización del ensayo, en concordancia con los organismos regulatorios. La *fase I de los ensayos clínicos* tiene como objetivo principal evaluar la toxicidad local y sistémica, y por ello se realizan en pocas personas (generalmente 10-20 por cohorte). En esta etapa se determina la dosis máxima tolerada. Además, se puede monitorear la inmunogenicidad. Una vez culminada esta etapa satisfactoriamente, es decir, si se demostró que la formulación no causa efectos adversos graves, comienza la siguiente fase. La *fase II de los ensayos clínicos* tiene como objetivo principal monitorear rigurosamente la reactogenicidad, toxicidad o aparición de cualquier efecto adverso en un grupo mayor de personas, y determinar la inmunogenicidad de la formulación. Esta etapa se realiza en mayor cantidad de personas que la etapa previa, generalmente en algunas decenas o hasta pocas centenas de voluntarios por cohorte. Una vez culminada esta etapa satisfactoriamente, es decir, si se demostró que la formulación logra desencadenar la respuesta inmune esperada y no causa efectos adversos graves, comienza la siguiente fase. La *fase III de los ensayos clínicos* tiene la finalidad de demostrar la eficacia de la vacuna, a la vez que se continúa monitoreando la aparición de efectos adversos causados por la vacunación. Esta etapa se realiza en miles de personas por cohorte. La eficacia de una vacuna es la capacidad de ésta de prevenir la enfermedad contra la que fue desarrollada. En el contexto de la fase III de los ensayos clínicos (controlados, multicéntricos, aleatorizados y generalmente de doble o triple ciego), se definen puntos de evaluación clínica para demostrar la reducción en la incidencia de infección o enfermedad luego de la inmunización. Una vez culminada esta etapa satisfactoriamente, es decir, si se demostró que la formulación logra una eficacia en la reducción de la infección o enfermedad satisfactoria (en general la OMS solicita que la eficacia sea mayor al 50 %, pero puede haber excepciones), y además no se detectaron efectos adversos graves, la vacuna es aprobada para ser comercializada y aplicada a la población general, lo que va a dar lugar a la *fase IV o farmacovigilancia*. Esta fase dura todo el tiempo durante el cual se comercialice el producto, y su finalidad es monitorear la seguridad, ya que al aplicarse a millones de personas de diversas características pueden detectarse efectos adversos graves y raros que no fueron detectados en las etapas previas¹⁷.

1.1.2. Cómo funcionan las vacunas

La vacunación utiliza la memoria inmunológica del sistema inmune, de forma tal que la exposición a una vacuna genera un pool de linfocitos B y T antígeno-específicos, que, frente a una nueva exposición al agente infeccioso, son activados rápidamente y logran controlar y eliminar al agente infeccioso. De esta manera la vacunación prepara al sistema inmune para defenderse frente a los agentes infecciosos¹⁸.

Cuando una vacuna es inoculada, se inicia una respuesta inmune debido a que los efectores del sistema inmune innato reconocen los distintos componentes de la vacuna así como también las señales de daño (DAMPs) propuestas por Polly Matzinger¹⁹, que se produzcan por la propia vacuna o por el acto de vacunar. La interacción de los distintos Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) con sus ligandos va a desencadenar cascadas enzimáticas que derivarán en la traslocación al núcleo de distintos factores de transcripción y en la expresión de distintos mediadores inmunes, tales como citoquinas o quemoquinas proinflamatorias. Actualmente se han identificado distintos tipos de PRRs, entre los que se incluyen los receptores tipo toll (TLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), y los recientemente descritos sensores citosólicos de ADN (CDSs)²⁰. Las células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), expresan un amplio repertorio de PRRs, lo que les permite un amplio reconocimiento de PAMPs o DAMPs. Luego de la interacción con sus ligandos, los PRRs gatillan complejas cascadas de activación enzimática que derivan en la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias. Además se induce un aumento de la capacidad de internalizar antígenos y presentar los mismos en el contexto de MHC de clase I (MHC-I, para antígenos intracelulares) o II (MHC-II, para antígenos extracelulares), tal como se muestra en la Figura 1A. Esto conlleva a la migración de las células residentes de tejido a los órganos linfoides secundarios, en general al ganglio drenante (dLN) donde activarán a los linfocitos B y T como se explicará mas adelante. La secreción de citoquinas y quemoquinas, promoverá además el reclutamiento de más efectores (células y moléculas) del sistema inmune innato al sitio de inoculación, lo que da como resultado la amplificación de las señales, y la generación de un ambiente proinflamatorio. Dependiendo del estímulo inicial, de los PRRs a partir de los cuales se haya iniciado la cascada enzimática, será la respuesta innata y luego adaptativa que se desencadene.

Además, otro de los mecanismos del sistema inmune innato es la activación de los complejos inflamasomas. Estos complejos son plataformas multiproteicas de alto peso molecular que a partir del estímulo adecuado se ensamblan en el citoplasma de las células estimuladas, y promueven la activación de caspasas proinflamatorias²¹. Esto deriva en la activación y secreción de citoquinas proinflamatorias de la familia de IL-1, que a la vez que promueven mecanismos de muerte celular que generarán DAMPs que también van a promover un ambiente proinflamatorio según se describe a continuación. Hay distintos complejos inflamasomas, y cada uno se caracteriza por ser iniciado por un PRR en respuesta al reconocimiento de PAMPs o DAMPs. Los inflamasomas canónicos están conformados por PRRs codificados en la línea germinal que, luego del estímulo adecuado, y típicamente a través de la molécula adaptadora ASC. Los PRRs que conforman los inflamasomas canónicos son NLRP1, NLRP3, NLRC2, AIM2 y pyrin. El inflamasoma no canónico involucra a Caspasa 11 en ratones o Caspasa 4 o 5 en humanos. El reconocimiento del ligando proinflamatorio, deriva en la activación, oligomerización y el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC, que contiene dos dominios: un dominio pyrin (PYD) y otro de reclutamiento de Caspasa (CARD). Estos dominios le permiten a ASC unirse a pro-caspasa-1. Debido al procesamiento autocatalítico mediado por proximidad que sufrirá esta molécula, se obtendrá la proteasa Caspasa 1 activa, lo que derivará en el clivaje de los zimógenos pro-IL-1 β y pro-IL-18 y en la secreción de las citoquinas IL-1 β e IL-18 activas. Además, Caspasa-1 promoverá el clivaje de GasderminaD, una proteína formadora de un poro en la membrana celular, a través del cual la célula excretará IL-1 β e IL-18 y que derivará en la

consecuente inducción de piroptosis, una forma proinflamatoria de muerte celular²². Gracias a la piroptosis se liberarán más DAMPs al medio, y alarminas, incluyendo IL-1 α , potenciando el ambiente proinflamatorio. Las citoquinas secretadas modularán la respuesta adaptativa humoral y celular, por lo que los inflamasomas resultan blancos muy interesantes para los adyuvantes de vacunas.

En el dLN, las APCs van a presentar el antígeno a las células del sistema inmune adaptativo, los linfocitos B y T específicos del antígeno²³ (Figura 1A). Al reconocer el antígeno, estos linfocitos se van a activar y van a sufrir el proceso de expansión clonal. Por su parte, las células B pueden ser activadas por las APCs, aunque también pueden reconocer al antígeno directamente mediante su receptor de membrana (BCR), y actuar ellas también como APC. El receptor de las células T (TCR), solo podrá reconocer al antígeno en el contexto de MHC, por lo que necesariamente necesita de la presentación por parte de una APC. Es importante destacar que, además del reconocimiento MHC-II-TCR, debe ocurrir la “segunda señal”, es decir la interacción de las moléculas de co-estimulación (tales como CD80, CD86, CD40 y sus ligandos en las células T). Por esta razón, para lograr la activación de las células T, es imprescindible la activación y la presentación antigénica por parte de las APCs. Dependiendo del contexto en el que el antígeno sea presentado, MHC-I o II, las APCs podrán activar a células T CD8⁺ o células T CD4⁺, respectivamente (Figura 1B). Estas últimas se conocen también como células “T helper” (Th) y en función de otras señales de co-estimulación, así como también de las citoquinas y del contexto proinflamatorio en el cual se da la sinapsis inmunológica entre las células Th y las APCs, podrán diferenciarse hacia el fenotipo Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T reguladoras (Treg) o foliculares (fTh). Los distintos fenotipos de células Th van a regular la actividad de otras células del sistema inmune mediante la secreción de distintas citoquinas y quemoquinas. En particular, las células Th1 van a secretar citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ , TNF- α , IL-2. IFN- γ va a incrementar la expresión de las moléculas MHC, a la vez que tiene potentes efectos antivirales. Esta citoquina también promueve la diferenciación y activación de células T CD8⁺ y otros fagocitos, tales como células *Natural Killer* (NK) o macrófagos con capacidad fagocítica aumentada, que cumplen un rol fundamental en la respuesta frente a patógenos intracelulares. Por lo tanto, el fenotipo Th1 está asociado a este tipo de respuesta^{24,25}. Los linfocitos T CD8⁺ tienen función citotóxica, y son células clave para eliminar células infectadas por patógenos intracelulares, tales como virus. El reconocimiento del antígeno en una célula infectada por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTL) es posible debido a que todas las células nucleadas pueden expresar MHC-I, y en caso de detectar un antígeno extraño en el medio intracelular, presentarlo en el contexto de esta molécula en su superficie. Además de eliminar células infectadas, los CTL pueden inhibir la replicación viral sin destruir a las células infectadas mediante la secreción de moléculas que interfieren con la replicación del patógeno, tales como interferones²⁶.

Las células Th2 se caracterizan por la secreción de citoquinas tales como IL-4, IL-5, e IL-13, y cumplen un rol clave en la activación de mastocitos y eosinófilos, necesarios para combatir algunos de los parásitos, y también patógenos extracelulares²⁷. Además, se caracterizan por promover altos niveles de anticuerpos. Las células Th17 tienen como función principal la eliminación de patógenos extracelulares, tales como bacterias y hongos. Para ello, promueven un ambiente proinflamatorio a través de la secreción de citoquinas, principalmente IL-17 o IL-22, aunque también producen TNF- α , IL-6, IL-21, IL-22 e IL-23, y promueven el reclutamiento de

otras células inmunes al sitio de infección²⁸. Recientemente, se ha descrito además que juegan un rol en la eliminación de las infecciones virales, aunque también pueden promover la infección de ciertos virus, y promover la patogenicidad debido al ambiente proinflamatorio que generan. Además, se ha reportado que juegan un rol en la promoción de algunas enfermedades autoinmunes, por lo que pueden tener un rol dual en la patogenicidad o inducción de la inmunidad. También algunas células Th17 pueden modular la respuesta inmune secretando factores de inmunosupresión, como IL-10²⁹. Las células Treg tienen funciones de inmunosupresión, y cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, controlando el daño excesivo promovido por la inflamación²⁹.

Como se mencionó previamente, la activación de células B puede ocurrir por el reconocimiento del BCR al antígeno directamente, o por la interacción con una célula T específica del antígeno. Los antígenos repetitivos, tales como polisacáridos bacterianos, pueden ser reconocidos directamente por el BCR de manera T-independiente, dando lugar a la secreción de anticuerpos de baja afinidad, en general IgM, que no generan memoria de forma tan efectiva como el reconocimiento T-dependiente, ya que frente a un nuevo encuentro con el antígeno, no se genera la rápida y potente respuesta secundaria característica de la generación de memoria (en el sentido clásico)^{30,31}. Sin embargo, cuando un BCR reconoce un antígeno extraño es internalizado, procesado, y presentado en su superficie a una célula T CD4⁺. Esta célula se va a diferenciar en una fTh, y va a suministrar señales a la célula B (Figura 1C). Gracias a estas señales de la colaboración B-T, la célula B va a sufrir expansión clonal e hipermutación somática, dando lugar a anticuerpos de alta afinidad y al cambio de clase de los mismos, generando distintas clases de anticuerpos, tales como IgA o IgG, e incluso en las distintas subclases de IgG que cumplirán diversas funciones. En particular, en modelo murino, los anticuerpos IgG2a/c se asocian a una respuesta de fenotipo Th1, mientras que los anticuerpos IgG1 se asocian a una respuesta tipo Th2. Por esta razón, la relación entre estas dos subclases de anticuerpos (además del estudio de otros efectores) puede utilizarse para identificar el fenotipo de respuesta que se está desarrollando. La activación de la respuesta adaptativa demora en general entre 10 y 14 días. No obstante, además de la activación y generación de linfocitos B y T efectores, también se generarán linfocitos de memoria, que frente a un nuevo encuentro con el antígeno van a ser capaces de generar una respuesta antígeno-específica rápida y potente^{26,32}, y por ello, la generación de una respuesta de memoria de largo plazo es el objetivo principal de la vacunación.



Figura 1: Generación de la respuesta inmune adaptativa frente a las vacunas. A: una vez que la vacuna se inyecta en el músculo, el antígeno es internalizado por DCs, que se activan a través de la interacción de sus PRRs con sus ligandos, que pueden ser señales de daño proporcionadas por los adyuvantes. Las DCs activadas migran al dLN, donde realizarán la presentación del antígeno peptídico en el contexto de MHC a las células T a través de su receptor TCR. Además, las células T promoverán la activación y diferenciación de las células B, lo que resulta en la generación de anticuerpos con maduración de la afinidad y diferentes isotipos. La generación de células plasmáticas de corta vida, que secretan anticuerpos antígeno-específicos, va a provocar un aumento del título de anticuerpos séricos por un periodo corto. También se producen células B de memoria, que perdurarán por largo tiempo. Las células plasmáticas de larga vida (LLPCs) pueden producir anticuerpos por largos periodos de tiempo. Las DCs también pueden activar células T CD8⁺ efectoras y de memoria, que son importantes para la eliminación de los patógenos intracelulares, tales como los virus. B: Presentación de antígeno de una DC (APC) a una célula T CD8⁺ o TCD4⁺. C: Presentación de antígeno de una DC a una célula fTh, e interacción de esta con una célula B. A fue adaptado de Pollard & Bijker 2021³². B y C fueron adaptadas de Schijns et. al. 2020³³.

Dado que los diferentes patógenos requieren distintas respuestas inmunológicas, se han utilizado distintas tecnologías en el desarrollo de plataformas vacunales, que se esquematizan en la Figura 2.

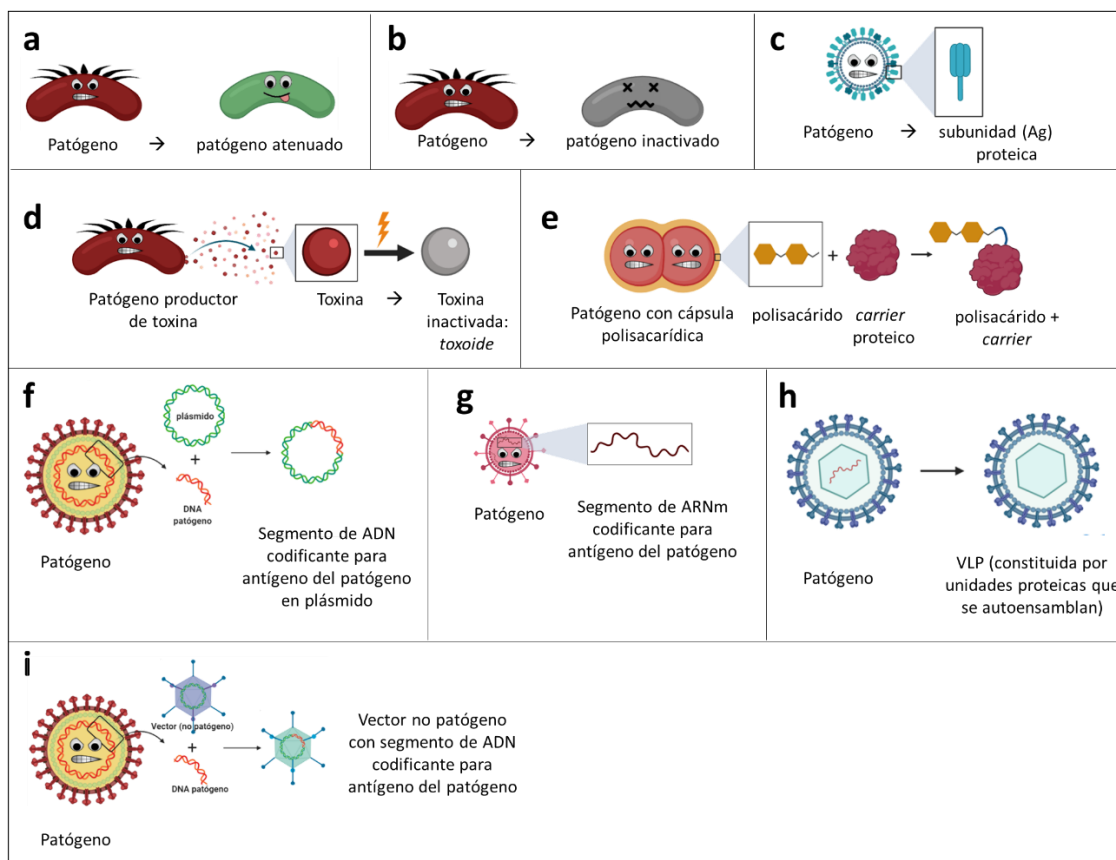


Figura 2. Tipos de plataformas vacunales. Se esquematiza las vacunas a microorganismos enteros vivos atenuados (a), las vacunas a microorganismos inactivados (b), y las vacunas de subunidades, dentro de las que se esquematizan las vacunas de subunidades proteicas (c), las vacunas a toxoides (d), las vacunas conjugadas (e), las vacunas a ADN (f), las vacunas a ARN (g), y las vacunas a partículas tipo virus (VLP, del inglés virus like-particles, h). Además se esquematizan las vacunas a vectores virales (i). Elaborado con Biorender.

Las vacunas de subunidades son una buena estrategia en términos de toxicidad, ya que en ellas sólo se incluye el antígeno contra el que se necesita desencadenar la respuesta inmune, y son menos reactogénicas que las vacunas a microorganismos enteros. Sin embargo, esto trae aparejado que en muchos casos sean tan poco reactogénicas, que ni siquiera se logre generar inmunogenicidad. Una estrategia para potenciar la inmunogenicidad en estas vacunas, es el agregado de adyuvantes, sobre los que tratará la sección siguiente.

1.2. Adyuvantes de vacunas

La palabra adyuvante deriva del latín “*adjuvare*”, que significa “*ayudar*”. Los adyuvantes son un conjunto heterogéneo de sustancias que aumentan, potencian, modulan, o prolongan la respuesta inmune frente al antígeno vacunal. Hay un amplio rango de sustancias que funcionan como adyuvantes, desde pequeñas moléculas sintéticas hasta extractos complejos y heterogéneos obtenidos de productos naturales, incluyendo componentes particulados de distintas composiciones y tamaños, entre los que se encuentran emulsiones, nanopartículas sintéticas y liposomas^{34,35}. Los adyuvantes se pueden utilizar para potenciar la inmunogenicidad, modular el tipo de respuesta inmune que se desencadena, reducir la cantidad de antígeno necesario por dosis o la cantidad de dosis (lo que se conoce como efecto *dose-sparing*), o mejorar la eficacia de las vacunas en determinadas poblaciones (adultos mayores, niños, individuos inmunodeprimidos, entre otras). Para lograr el efecto óptimo, la elección del adyuvante para una formulación se debe hacer cuidadosamente, y la formulación se debe realizar de la manera apropiada³⁶. Los adyuvantes de primera generación se desarrollaron empíricamente con el fin de potenciar la respuesta inmune frente a antígenos poco inmunogénicos. De estos, sólo las sales de aluminio y los adyuvantes oleosos (aceite en agua, basados en escualeno) han sido licenciados en vacunas por la FDA³⁴. Gracias al avance en el conocimiento sobre los mecanismos del sistema inmune, actualmente el desarrollo de adyuvantes se basa en el diseño racional, y para ello es clave entender su mecanismo de acción. En este sentido, en los últimos años se han licenciado vacunas para humanos que contienen adyuvantes basados en el diseño racional en su formulación. A pesar de ello, el número de adyuvantes disponibles para uso en humanos es limitado y su uso, así como también el *know-how* para su correcta formulación a granel, está bajo patentes de pocas compañías. Esto constituye una de las principales barreras para el desarrollo de nuevas vacunas o inmunoterapias efectivas³⁶, y por ello es tan necesario el desarrollo y la caracterización de nuevas sustancias que puedan ser utilizadas como adyuvantes.

Dado que las vacunas profilácticas se administran a individuos sanos, masivamente y, en general, en individuos muy jóvenes (al nacer o a las pocas semanas o meses de vida), es muy importante evaluar cualquier riesgo (seguridad) o eventos adversos (tolerabilidad) asociados a la vacunación. Sin embargo, las vacunas terapéuticas, por ejemplo, aquellas para tratar distintos tipos de cáncer, tienen un balance riesgo-beneficio diferente. El desarrollo de adyuvantes se basa en potenciar o dirigir las respuestas inmunes desencadenadas por la vacunación sin comprometer la seguridad y, por lo tanto, todos los componentes que formen parte de las vacunas deben estar debidamente caracterizados, y se debe entender muy bien su mecanismo de acción^{13,34}.

El descubrimiento de que algunas sustancias funcionan como adyuvantes de vacunas ha sido históricamente empírico y su mecanismo de acción, incluso el de adyuvantes utilizados durante décadas, aún no ha sido completamente dilucidado.

1.2.1. Desarrollo de los adyuvantes

El desarrollo de adyuvantes para uso en vacunas humanas ha sido uno de los procesos más lentos en la historia de la medicina³⁷. Como muchos descubrimientos científicos, el hallazgo de que el agregado de una sustancia (adyuvante) a una vacuna potenciaba la respuesta inmune

desencadenada contra el antígeno vacunal fue por azar. En 1925, Gastón Ramón (1886-1963, Figura 3), un veterinario francés que trabajaba en la producción de sueros anti-toxina diftérica en el Instituto Pasteur de París, observó que el rendimiento de los sueros en caballos era mayor en los animales que desarrollaban abscesos en el sitio de inoculación³⁸. Luego de esta observación, comenzó a inocular a los caballos distintas sustancias tales como almidón, tapioca, extractos vegetales (que entre sus componentes tenían saponinas), aceites de pescado, entre otras, junto con la toxina inactivada, con el fin de generarles abscesos estériles, y de esta manera fue capaz de incrementar la producción de anti-suero. Así confirmó la hipótesis de que las sustancias que promovían una inflamación local en el sitio de inoculación también promovían una mayor producción de suero anti-toxina inactivada (el antígeno)³⁹. Por este y otros aportes en el área de inmunología y vacunas, Gastón Ramón fue nominado a recibir el premio Nobel 155 veces, aunque nunca lo ganó, siendo la persona que más nominaciones tiene al Nobel sin haberlo recibido⁴⁰. En 1926, el inmunólogo británico Alexander Glenny evidenció el mismo efecto causado por las sales de aluminio⁴¹. Estos componentes se utilizaron por primera vez en vacunas a toxoides para humanos en 1932. Desde entonces, las sales de aluminio fueron los únicos adyuvantes utilizados en vacunas humanas durante 70 años, debido a que a pesar de que su efecto potenciador era claro, no se conocía con exactitud el mecanismo de acción de estas sustancias, y por lo tanto tampoco sus potenciales efectos nocivos⁴².

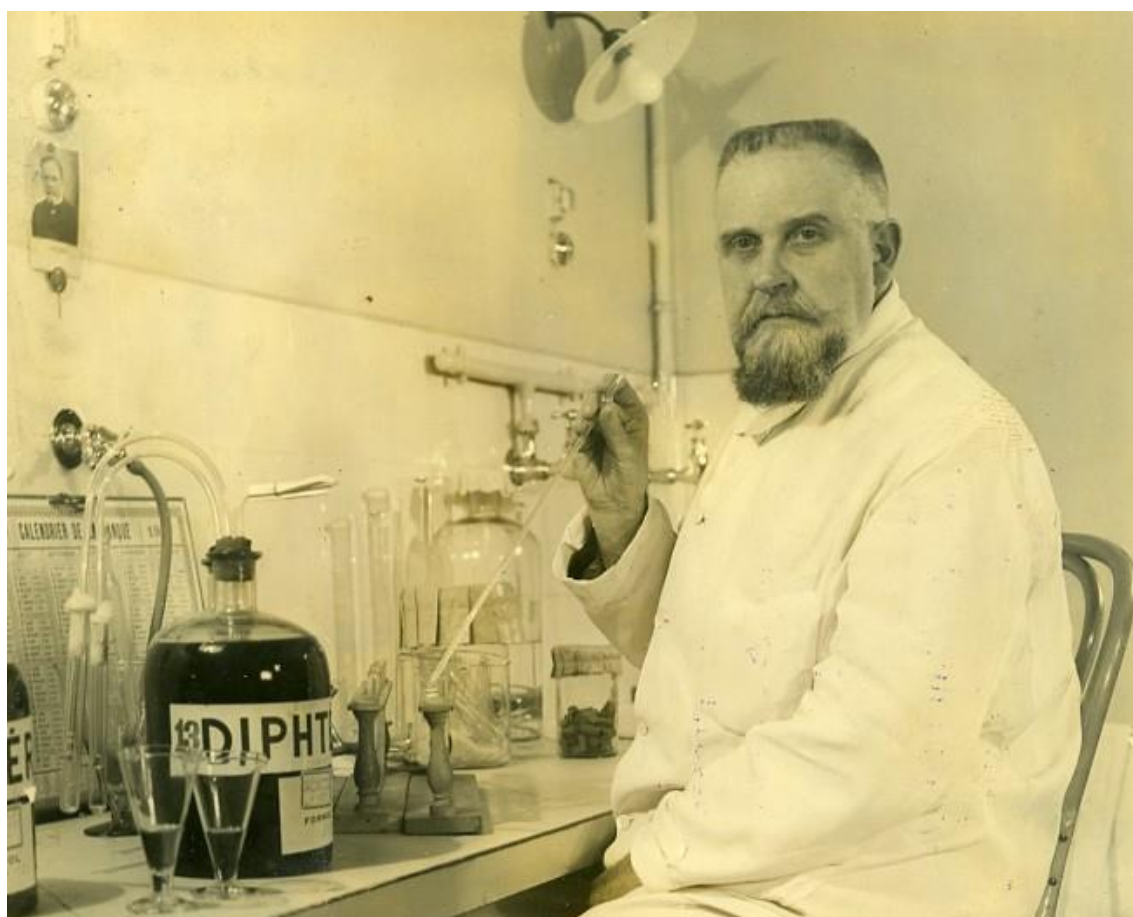


Figura 3: Gastón Ramón en su laboratorio. Gastón Ramón, veterinario y microbiólogo francés en su laboratorio de París en 1941. Nótese la imagen de Louis Pasteur colgada en la pared. (Foto disponible en <https://prabook.com/web/gaston.ramon/2457511#gallery>).

Durante todo este tiempo se ha estudiado el potencial adyuvante de numerosas sustancias de diversa naturaleza, pero la mayoría no fueron adecuadas para ser usadas en vacunas para humanos. Durante la década de 1940 Jules Freund desarrolló el “Adyuvante de Freund”: una emulsión agua-en-aceite en la que el antígeno se emulsiona en gotículas de agua en una fase oleosa mineral continua que en el caso del Adyuvante Completo de Freund (CFA) contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivado, pero en el caso del Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) carece de este componente⁴³. Éste último fue utilizado brevemente en una vacuna contra influenza en Inglaterra durante la década de 1960, pero debido a la alta reactogenicidad que provocaba, su uso fue suspendido y la vacuna fue retirada del mercado. Estudios posteriores demostraron que estos adyuvantes causaban efectos adversos⁴⁴, y por lo tanto se dejaron de utilizar para vacunas en humanos. No obstante, este adyuvante derivó en la generación de otros adyuvantes oleosos (agua-en-aceite), en los que gotículas oleosas se emulsionan en una matriz continua acuosa. Los primeros adyuvantes oleosos contenían escualano, un compuesto oleoso no metabolizable, que luego fue sustituido por el escualeno, que sí es metabolizable. Durante la década de 1970 se desarrollaron otros adyuvantes, tales como saponinas (a las que dedicaremos una sección aparte ya que son el objeto de estudio de esta Tesis), los virosomas y liposomas, nano o microesferas lipídicas que encapsulan o integran antígenos en sus membranas, aunque no se logró que formaran parte de formulaciones vacunales licenciadas para humanos. No obstante, el conocimiento derivado de todas estas formulaciones, en particular de las emulsiones, derivó en el desarrollo del primer adyuvante incluido en vacunas licenciadas para humanos, 70 años después del inicio del uso de las sales de aluminio como adyuvantes: el MF59^{45,46}. Los investigadores de Chiron Vaccines (luego adquirida por Novartis) utilizaban el escualeno para formular una emulsión de agua en aceite (MF59) como sistema de entrega de derivados del muramil dipéptido (MDP). A estos derivados se les agregaba lípidos, de manera de facilitar su solubilidad en formulaciones lipídicas. Lamentablemente, las emulsiones conteniendo estos compuestos tenían altos niveles de reactogenicidad, por lo que su uso no era aceptable. Sin embargo, a partir de estos estudios preclínicos se pudo determinar que los derivados de MDP no eran necesarios para conferir la capacidad adyuvante que MF59 demostró en una formulación con influenza⁴⁷. Esto fue posteriormente confirmado en estudios clínicos^{48,49}, en los que también se demostró la seguridad de este nuevo adyuvante⁵⁰. De esta manera, en 1997, se logró la aprobación del primer adyuvante que no estaba basado en sales de aluminio para humanos. Esta vacuna, una vacuna contra influenza, trivalente e inactivada denominada Flud® (Novartis), fue licenciada inicialmente en Italia y luego en más de 30 países para su uso contra la influenza estacional en adultos mayores a 65 años^{46,51}.

A pesar de que las sales de aluminio y los adyuvantes oleosos demostraron ser seguros y a la vez potenciar la respuesta inmune, no se lograba comprender cómo eran los mecanismos que subyacían esta potenciación. Por esta razón, durante la mayor parte del siglo XX el avance en el desarrollo de adyuvantes fue muy lento y se basó en datos empíricos, al punto que Janeway se refirió a los adyuvantes como “el secreto sucio de los inmunólogos” (“immunologists’ little dirty secret”)⁵². Sin embargo, el descubrimiento en 1996 de los TLRs en *Drosophila*, su rol en la resistencia de estos organismos a la infección por hongos y la relación encontrada por Janeway en 1997 entre el TLR4 y el inicio de la respuesta inmune adaptativa fueron determinantes para comenzar a dilucidar el mecanismo de acción de los adyuvantes⁴². El establecimiento del rol del TLR4 en el reconocimiento del LPS⁵³ derivó en que se desarrollaran sustancias similares al LPS

pero con menor toxicidad, de manera de estimular al TLR4 y desencadenar la cascada proinflamatoria y la consecuente respuesta inmune⁵⁴. De esta manera comenzó el desarrollo de adyuvantes agonistas de TLRs o PRRs. Desde inicios de 1980s se había descubierto que era posible producir una molécula obtenida a partir del LPS de *Salmonella minnesota* con la capacidad inmunoestimulante pero sin la toxicidad asociada al LPS⁵⁵. Treinta años después, en 2009, esta molécula, conocida como Monofosforil lípido A (MPL), se incluyó en la vacuna Cervarix contra el virus del papiloma humano, y se convirtió en el primer adyuvante desarrollado a partir del diseño racional que se incluyó en una vacuna para humanos. A partir de entonces, se han estudiado una amplia gama de compuestos a ser utilizados como adyuvantes, que se detallan en la Tabla 1. Cabe mencionar que las saponinas son también compuestos inmunoestimulantes, pero dado que el objetivo de estudio de esta tesis es justamente sobre estos componentes, se expondrá sobre estas sustancias, así como también los complejos inmunoestimulantes formulados con ellas en el siguiente apartado.

A medida que aumenta el conocimiento sobre las distintas sustancias utilizadas como adyuvantes, tanto de su estructura como de su mecanismo de acción, una estrategia que se utiliza es la de combinar dos o más adyuvantes o compuestos inmunoestimulantes de forma racional, para potenciar aún más la respuesta, o para dirigirla a blancos moleculares específicos, manteniendo niveles aceptables de reactogenicidad^{56–58}. Tal es el caso de los Sistemas de Adyuvantes (*Adjuvant Systems*TM, AS) desarrollados por GlaxoSmithKline (GSK), entre los que se incluyen el AS01, AS02, AS03 y AS04, que también se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de los principales adyuvantes incluidos en vacunas ya licenciadas, o en vacunas en ensayos clínicos. Adaptado de O'Hagan et. al. 2020⁵⁹

Adyuvante	Descripción	Vacunas	Grado de avance/elementos clave
Adyuvantes incluidos en vacunas licenciadas			
Sales de aluminio	Suspensiones estables de sales de hidróxido o fosfato, o hidróxido-sulfato de aluminio amorfo.	Incluidos en múltiples vacunas utilizadas de rutina en niños, tales como en la triple bacteriana contra difteria, tétanos, y pertusis (acelular, DTaP), Coronavac contra SARS-CoV-2.	Décadas de uso, y de datos de seguridad e inmunogenicidad. Se están estudiando nuevas formulaciones de alum, y también el uso en un sistema de entrega particulado a ser usado como inmunoestimulantes.
Emulsiones oleosas (MF59, AS03, AF03)	emulsiones oleosas de escualeno estabilizado con surfactantes no-iónicos; puede incluir otros componentes oleosos y estabilizantes.	Vacunas de influenza estacional (MF59 en Fludax) y pandémica (AS03 en Pandemrix)	Gran base de datos sobre seguridad e inmunogenicidad. Efectivos en inducir altos niveles de anticuerpos.
MPL	Molécula derivada de un ligando de TLR4 adsorbido en depósito de L-tirosina junto a alérgenos modificados	Vacuna para desensibilización en casos de alergia al polen (Pollinex)	MPL obtenido de Salmonella minnesota es uno de los primeros agonistas de TLRs (TLR4) evaluado como adyuvante de vacunas.
AS04	MPL adsorbido en alum	Vacuna contra HPV (Cervarix) y contra HBV (Fendrix)	AS04 fue el primer adyuvante "combinado" en ser licenciado, y permitió allanar el camino para continuar desarrollando sistemas de adyuvantes
RC-529	Glicolípido sintético adsorbido a Alum.	Vacuna contra HBV (Supervax, Argentina, y en ensayos clínicos en vacuna contra influenza.	Molécula similar al Lípido A fue uno de los primeros inmunoestimulantes sintéticos testeados en humanos como adyuvantes.
AS01	Liposoma con MPL y QS-21	Vacuna contra Malaria (RTS,S) y Herpes Zóster (HZ/su y Shingrix)	AS01 es el primer sistema de adyuvantes que muestra la sinergia de 3 adyuvantes.
CpG ODN (1018 ISS)	oligonucleótido soluble, ligando de TLR9	Vacuna contra HBV (Heplisav-B) para adultos mayores de 18 años.	Su aprobación en la vacuna contra HBV permitió que se utilizara en fases clínicas de una vacuna contra Covid-19.
Virosomas	Liposomas unilamelares asociados a proteínas virales y a fosfolípidos aislados de una cepa del virus de influenza.	Fueron licenciados en dos vacunas contra influenza, aunque actualmente no se comercializa ninguna de las dos.	Se desarrollaron en la década de 1970, y se utilizaron en más de 50 millones de dosis distribuidas en todo el mundo. Los liposomas son seguros, bien tolerados e inmunogénicos.
MATRIX M	Nanocomplejos conformados por colesterol, fosfolípidos y saponinas	Vacuna contra Covid-19 NVX2373 de Novavax. Una vacuna contra RSV falló en fase III.	Las saponinas facilitan la entrega de antígeno a nivel intracelular. Aprobada en el contexto de la pandemia de Covid-19.
Principales adyuvantes en fases clínicas			
ISCOMs - ISCOMATRIX™	Complejos inmunoestimulantes con estructura tipo caja de aproximadamente 40 nm, formados por colesterol, fosfolípidos y saponinas	Vacuna contra influenza	Se dedicará una sección de la tesis a estos adyuvantes.
Montanide ISA51 e ISA 720 emulsion w/o	Emulsión agua en aceite en proporción 50/50 en ISA51 o 70/30 con aceite no mineral para ISA720	Vacunas contra malaria e Influenza. Montanide ISA51 es parte de una vacuna terapéutica contra cancer licenciada en Cuba.	
R848 (Imiquimod)-agonista de TLR7	Pequeña molécula, formulación en crema tópica.	Vacuna contra influenza, aplicado como crema tópica previo a la vacunación.	Aprobado con el nombre comercial de "Aldara" para queratosis actínica en 1997, Imiquimod se utiliza como un regulador de la respuesta inmune en esta enfermedad o en carcinoma basocelular.
GLA-SE	Emulsión aceite de escualeno en agua con tocoferol como antioxidante y GLA, un agonista sintético de TLR4.	Vacunas contra tuberculosis, RSV y leishmaniasis	Ensayos clínicos en curso
CAF01	Vehículo liposomal catiónico - Dimetil dioctadecil amonio (DDA), con capacidad de liberar dibehenato de trealosa (TDB), un agonista del receptor Mincle (un tipo de CLR).	Vacunas contra tuberculosis y clamidia	CAF01 se encuentra en ensayos clínicos con distintos antígenos recombinantes de M. tuberculosis. Estudios con este adyuvante sirvieron de prueba de concepto para la inoculación intrapulmonar mediante <i>spray</i> .
Advax™ (Vaxine)	Partícula de polisacárido cristalino obtenido de plantas (delta inulina).	Vacunas contra influenza, HBV, Malaria, West Nile Virus, y Covid-19	También se investiga el uso de Advax junto con CpG, un agonista de TLR9.
Flagelina agonista de TLR5 en VAX2012Q,	Proteína bacteriana flagelina (agonista de TLR5) fusionada genéticamente a los antígenos vacunales.	Vacuna contra influenza tetravalente VAX2012Q.	También se investiga el uso de VAX125.
Poly I:C / PIKA	Polímero análogo al ARN de doble hebra, y ligando de TLR3	Vacuna contra la rabia y contra influenza	Este ligando de TLR3 está disponible comercialmente, y su inmunogenicidad sido estudiada en múltiples ensayos preclínicos y clínicos junto a otros adyuvantes particulados tales como Alum.

1.2.2. Principales adyuvantes y sus mecanismos de acción

1.2.2.1. Sales de aluminio

Los adyuvantes basados en sales de aluminio fueron los primeros adyuvantes en ser utilizados (desde 1932), y durante 70 años fueron los únicos adyuvantes incluidos en vacunas humanas. En la actualidad continúan siendo los adyuvantes más utilizados, tanto en vacunas para humanos como veterinarias, aunque recién en los últimos años se ha comenzado a elucidar su mecanismo de acción. El término “sales de aluminio” abarca varios compuestos, dentro de los cuales hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alum (sulfato de potasio y aluminio) son los más utilizados. Sin embargo, estos términos, aunque utilizados ampliamente, no son estrictamente correctos, e incluso en algunas ocasiones el término “alum” se utiliza para referirse a todos los adyuvantes basados en sales de aluminio. El adyuvante “hidróxido de aluminio” no es $\text{Al}(\text{OH})_3$ sino oxihidróxido de aluminio cristalino (AlOOH)⁶⁰. Esta diferencia es importante, ya que el primero tiene un área superficial de $20 \text{ m}^2/\text{g}$, mientras que este último tiene un área superficial de $500 \text{ m}^2/\text{g}$, lo que hace que sea un compuesto más adecuado para la adsorción antigénica. La superficie del oxihidróxido de aluminio está compuesta de grupos Al-OH y Al-O-Al y tiene un punto isoeléctrico (pI) de 11,4, por lo que exhibe carga negativa a pH fisiológico de 7,4. Por otro lado, la superficie del fosfato de aluminio está compuesta por los grupos Al-OH y Al-OPO_3 y su pI varía entre 9,4 y 4,5, dependiendo del grado de sustitución por los grupos sulfato⁶¹, por lo que a pH fisiológico puede exhibir carga positiva o negativa. Entre otras características, la carga superficial de los adyuvantes es importante por las interacciones electrostáticas entre éstos y el antígeno en la formulación vacunal. En general, “alum” se refiere al sulfato de potasio y aluminio $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, un compuesto soluble en agua, que fue el primer adyuvante utilizado. Sin embargo, dado que su método de preparación consistía en precipitación *in situ*, lo que acarreaba baja reproducibilidad, fue reemplazado por otras sales de aluminio^{62,63}. La manera de adsorber el antígeno a estos adyuvantes es mediante interacción electrostática, fuerzas hidrofóbicas, e intercambio de ligandos. Las interacciones electrostáticas son posiblemente el mecanismo de adsorción más utilizado, y se pueden optimizar seleccionando antígenos y adyuvantes que tengan un pI tal que a pH fisiológico presenten cargas opuestas. Se debe evitar el congelamiento de las vacunas que contengan sales de aluminio, ya que éste puede afectar tanto al adyuvante como al antígeno que tenga adsorbido. En particular, el congelamiento induce la formación de coágulos que no se disgregan por agitación, por lo que en caso de inocular una formulación con sales de aluminio que fue congelada, se puede generar una alta reactogenicidad. Por esta razón, es muy importante cuidar la cadena de frío de las vacunas, ya sea para impedir el congelamiento por lo anteriormente explicado, como también evitar que estén expuestas a altas temperaturas poniendo en riesgo la integridad antigénica.

Estos adyuvantes promueven potentes respuestas humores con perfil Th2, pero fallan en inducir respuestas celulares o citotóxicas, típicamente Th1. A pesar de su extenso uso, aún no se termina de comprender su mecanismo de acción, aunque hay varios de ellos propuestos. Inicialmente se postuló que estos adyuvantes actuaban mediante el “efecto depósito”, es decir, liberando al antígeno lentamente para realizar un estímulo continuo y prolongado en el tiempo, promoviendo la producción de anticuerpos, debido a que se evidenció que los antígenos con mayor afinidad de unión al adyuvante promovían respuestas humores más potentes. Sin embargo, esta hipótesis es controversial, ya que, si luego de la inoculación se extirpa quirúrgicamente el sitio de inoculación, no ocurren cambios en la respuesta inmune

desencadenada⁶⁴. Varios grupos han reportado que las sales de aluminio activan al complejo inflammasoma NLRP3, aunque no se ha podido determinar cómo⁶⁵⁻⁶⁷. Se ha propuesto que la citotoxicidad causada por estos adyuvantes promueve la secreción de ácido úrico, DAMP que sería responsable de la activación del inflammasoma^{66,68}. Otros estudios revelaron que los cristales de alum interaccionan directamente con los lípidos de la membrana de las células dendríticas, y esto desencadena cascadas de señalización, independientes del complejo inflammasoma, pero dependientes de la vía de activación de la quinasa Syk-PI3⁶⁹. La activación de la vía PI3 se ha asociado a la baja inducción de la inmunidad celular por parte de las sales de aluminio, ya que esta vía inhibe la producción de IL-12p70, una citoquina producida por APCs clave en la polarización de células T hacia un fenotipo Th1⁷⁰. Otra hipótesis es que el agregado de sales de aluminio “convierte” a un antígeno soluble en un componente particulado, y por lo tanto puede ser internalizado por las APCs de forma más eficiente. En particular, se demostró que antígenos eluidos de una formulación con sales de aluminio eran internalizados por DCs por macropinocitosis, mientras que si el antígeno permanecía adsorbido al adyuvante, era internalizado por las DCs mediante fagocitosis. Además, si el tamaño de las partículas era menor al tamaño de las DCs, se promovía una mayor internalización del antígeno⁷¹. En este sentido, se evidenció que las nanopartículas de oxihidróxido de aluminio promovían un mayor procesamiento antigénico que las micropartículas del mismo compuesto⁶⁸. Es probable que la acción de estos adyuvantes no ocurra por un mecanismo concreto, sino por la sinergia de la activación de todos los mecanismos descritos, e incluso otros que aún no se han identificado.

1.2.2.2. Emulsiones

Las emulsiones han sido muy utilizadas en vacunas veterinarias, debido a que son relativamente fáciles de producir, son costo-efectivas y han demostrado promover buenas respuestas de anticuerpos. Hay distintos tipos de emulsiones con diferente mecanismo de acción. Las emulsiones “agua-en-aceite” (del inglés “*water-in-oil*”, W/O) consisten en una dispersión de gotas acuosas dispersas en una matriz oleosa. El antígeno estará en las gotas acuosas y será liberado lentamente al degradarse el componente oleoso luego de la inoculación. El efecto depósito impide que el antígeno sea degradado rápidamente por fagocitosis, prolongando el tiempo en que el antígeno estará disponible durante el reclutamiento celular y podrá ser internalizado por las APCs. Los ejemplos más conocidos de adyuvantes W/O son el CFA o IFA. Como se mencionó previamente, estos adyuvantes no se utilizan en humanos por razones de toxicidad. Sin embargo, otros adyuvantes basados en emulsiones sí se utilizan en humanos. Además del MF59 explicado previamente, otros adyuvantes oleosos son los basados en Montanide, tales como ISA[™] (*Incomplete Seppic Adjuvant*, SEPPIC Inc. Fairfield, NJ, USA) 51 o ISA 720. Estos últimos son una nueva generación de adyuvantes oleosos para humanos, que han sido utilizados en más de 200 ensayos clínicos de vacunas terapéuticas para cáncer o enfermedades autoinmunes, así como también de vacunas profilácticas contra HIV y malaria⁷². Los adyuvantes basados en emulsiones no solo potencian el título de anticuerpos en respuesta a la vacunación, sino que también potencian la respuesta de linfocitos T citotóxicos, y pueden estimular el reclutamiento de APCs, favoreciendo la internalización y presentación de antígeno por parte de estas células⁷².

Durante años, las emulsiones oleosas se clasificaron como meros vehículos y se asumía que su mecanismo de acción consistía en potenciar la entrega de antígeno a las APCs o al dLN, aunque muchos antígenos no se asociaban físicamente en las gotículas. Sin embargo, se ha demostrado que las emulsiones estimulan al sistema inmune indirectamente. En este sentido se ha demostrado que, al ser inoculado, MF59 induce la producción de PTX3 y JunB en las fibras musculares, lo que a su vez induce la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y ligandos de quemoquinas (CCL), lo que resulta en la activación de las APCs residentes de tejido, y en el reclutamiento y activación de las APCs circulantes⁷³. Un mecanismo similar fue descrito para AS03, aunque se demostró que este adyuvante induce también la producción de IL-6, gracias a su componente α -tocoferol⁷⁴.

1.2.2.3. Agonistas de PRRs

Como se mencionó previamente, el reconocimiento inicial de un patógeno, agente extraño o DAMP es crucial para poder desencadenar una respuesta innata proinflamatoria inicial y a su vez activar una respuesta adaptativa antígeno específica. El avance en el conocimiento y la elucidación de los PRRs y así como también la identificación de sus ligandos, ha dado lugar al desarrollo de una serie de inmunoestimulantes, muchos de los cuales se han incluido en vacunas licenciadas para humanos y animales³⁸. De esta manera, utilizando distintas moléculas como adyuvantes o inmunoestimulantes, que estimulen distintos PRRs, se logra desencadenar respuestas innatas y luego adaptativas con distinto fenotipo⁷⁵⁻⁷⁷. En la Figura 4 se esquematiza la estimulación por distintas sustancias utilizadas como adyuvantes o inmunoestimulantes en vacunas ya licenciadas o en estudios clínicos o preclínicos, así como también la respuesta inmune desencadenada.

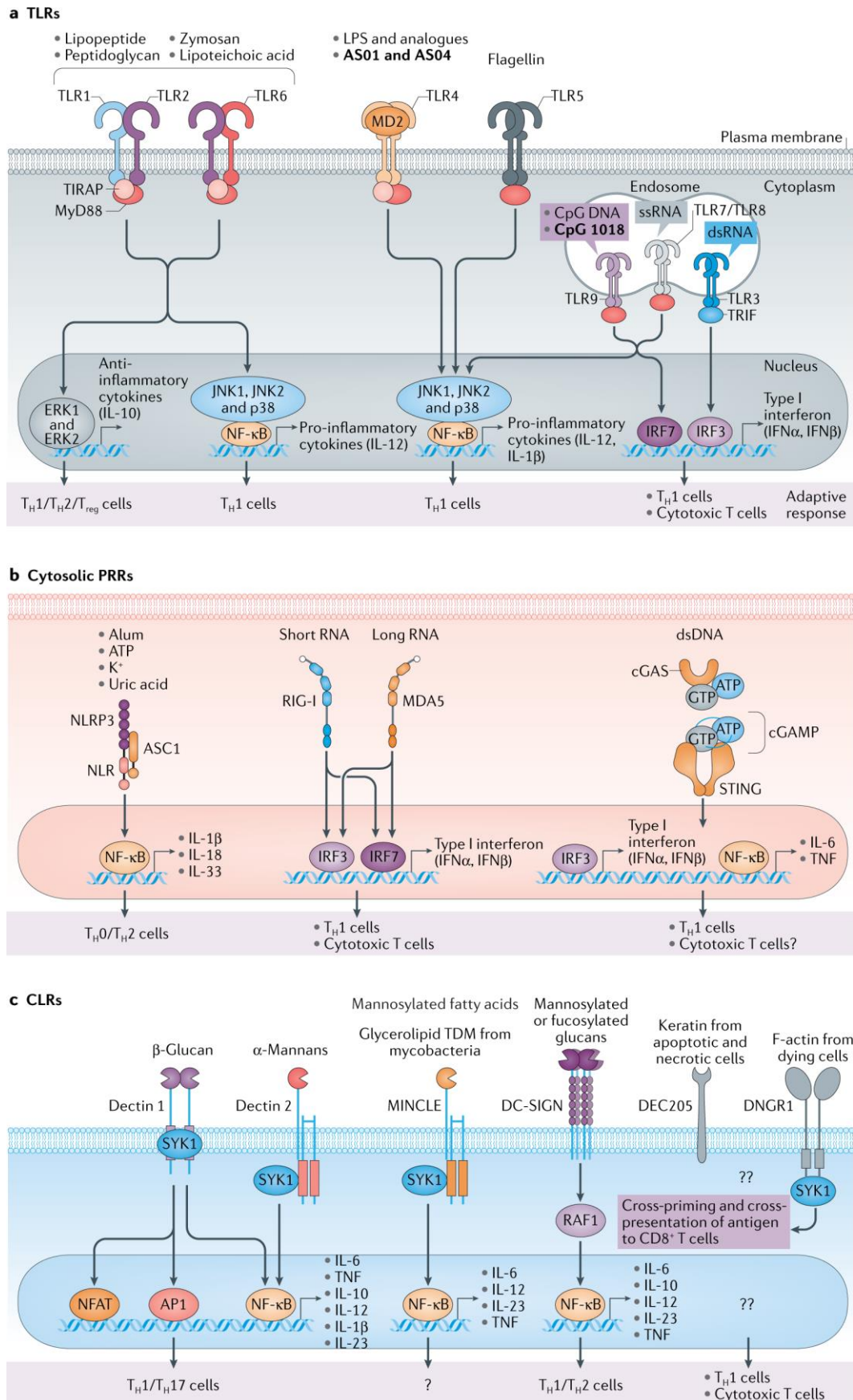


Figura 4: Interacción de los adyuvantes con los distintos PRRs. Se muestran las vías de señalización de los diferentes adyuvantes y DAMPs por los distintos receptores TLRs (a), citosólicos (b) y CLRs (c). Además, en cada caso se indican los mecanismos efectorios que desencadenan. Adaptado de Pulendran et. al. 2021⁵⁸.

1.2.2.4. Activación del inflamasoma

Varios adyuvantes utilizados en vacunas licenciadas o en vacunas experimentales, tales como sales de aluminio, saponinas o emulsiones, han sido identificados como activadores de alguno de los complejos inflamasoma, tal como se muestra en la Figura 5. Además, al conocer los mecanismos por los cuales se activan estos complejos, y los mecanismos efectores que desencadenan, la activación de éstos se ha utilizado como blanco para promover respuestas proinflamatorias más potentes.

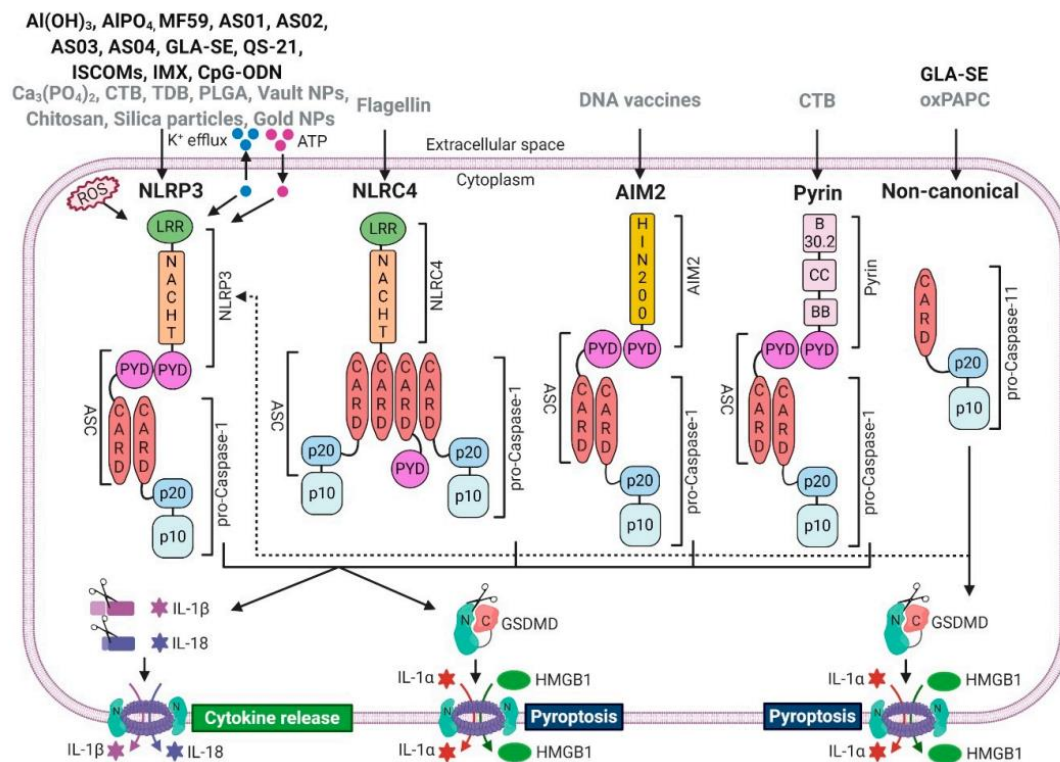


Figura 5. Activación de complejos inflamasomas por parte de los adyuvantes. Los adyuvantes, aprobados en vacunas licenciadas para humanos (en negro) o en vacunas experimentales (en gris), pueden (potencialmente) inducir el ensamblado y activación de complejos inflamasomas canónicos (tales como NLRP3, NLRC4, AIM2, Pyrin) o no canónicos (Caspasa 11 en ratones y Caspasa 4/5 en humanos). Los inflamasomas canónicos reclutan Caspasa 1 vía la molécula adaptadora ASC, lo que lleva al auto-procesamiento por proximidad y auto activación de Caspasa-1, que luego derivará en el clivaje de los zimógenos pro-IL-1β y pro-IL-18, y a la liberación de estas citoquinas de forma activa. Caspasa 1 activada también cliva y activa Gasdermina D (GSDMD), lo que resulta en la formación de un poro en la membrana y en piroptosis, lo cual media la liberación de DAMPs proinflamatorios tales como IL-1α o HMGB1. La activación de Caspasa 11 deriva en el clivaje de GSDMD y en la inducción de piroptosis, pero no en el clivaje de pro-IL-1β y pro-IL-18. Sin embargo, la activación por la vía no canónica, también activa al inflamasoma NLRP3, que indirectamente va a promover la secreción de IL-18 e IL-1β. Abreviaciones: ASC: proteína tipo speck conteniendo un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasa); PYD: dominio pyrin; HMGB1: caja 1 del grupo de alta movilidad; LRR: repeticiones ricas en leucina; NATCH: dominio presente en NAIP, CIITA, HET-E y TP1. GSDMD: Gasdermina 1; ROS: especies reactivas del oxígeno; ATP: adenosin trifosfato; CC: hélice superenrollada (coiled coil), B30.2: dominio del exón B30.2; BB: dominio de dedo de zinc tipo caja B; ISCOM: complejo inmunoestimulante; IMX: ISCOMATRIX™. Adaptado de Reinke et. al. 2020⁷⁸.

1.3. Saponinas

Desde la antigüedad se han utilizado plantas de forma medicinal. A medida que se avanza en el conocimiento, se han podido identificar los principios activos en las distintas especies vegetales responsables del efecto medicinal observado. Actualmente los componentes extraídos de especies vegetales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y forman parte de numerosos productos biofarmacéuticos. Algunos de los compuestos bioactivos más importantes son los flavonoides, alcaloides y las saponinas.

El término “saponina” deriva del latín “sapo” que significa “jabón”. Las saponinas son moléculas anfipáticas producidas por muchas especies vegetales y algunos animales marinos, como un mecanismo químico de defensa frente a patógenos y herbívoros, por lo que se considera que estos metabolitos secundarios son esenciales en el “sistema inmune innato” de estos organismos⁷⁹. Su estructura se compone de una región apolar, denominada aglicona, y una región polar, constituida por residuos polisacáridicos unidos a la aglicona por al menos un enlace glicosídico (Carbono-Oxígeno, C-O) en el C3 de la aglicona. Esta estructura le confiere propiedades anfipáticas y al igual que el jabón, las saponinas forman espuma en soluciones acuosas. Las saponinas son moléculas complejas, con alto peso molecular y contienen entre 27 y 30 átomos de carbono en la porción no-sacarídica. Dependiendo de las características de la aglicona, las saponinas se pueden clasificar en esteroideas o triterpénicas⁸⁰. Estas últimas son las saponinas más ampliamente distribuidas en los vegetales, y el término “triterpénicas” se debe a que la región apolar se compone de tres moléculas de monoterpenos, cada uno de los cuales está formado por 10 átomos de carbono. Para formar el triterpeno, los 30 átomos de carbono se distribuyen en 6 moléculas de isopreno, por lo que son moléculas pentacíclicas. A su vez, dependiendo de la cantidad de cadenas oligosacáridicas unidas a la aglicona, las saponinas triterpénicas se pueden clasificar en monodesmosídicas (1 cadena, normalmente con enlace en C3 de la aglicona) o bidesmosídicas (2 cadenas, normalmente con enlace en C3 y C24 o C28 de la aglicona).

Esta estructura confiere a las saponinas propiedades detergentes, emulsionantes, hemolíticas⁸¹, antivirales⁸², antibacterianas⁸³, antifúngicas⁸⁴, insecticidas, molusquicidas⁸⁵, citotóxicas⁸⁶ y anticancer^{87,88}. Entre otras actividades, se ha reportado que las saponinas tienen capacidad de disminuir el colesterol en animales y humanos⁸⁹ y son efectivas en el tratamiento de algunas enfermedades metabólicas y vasculares⁹⁰. Por todas estas razones, las saponinas obtenidas de diversas especies vegetales son utilizadas en varias ramas de la industria entre las que se destacan la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Además, las saponinas triterpénicas bidesmosídicas producidas por los árboles del género *Quillaja*, han demostrado poseer capacidad inmunoestimulante, por lo que se utilizan como adyuvantes de vacunas.

1.3.1. Saponinas de *Quillaja saponaria*

Actualmente se comercializan pocos extractos de saponinas, y en general son obtenidos del árbol chileno *Quillaja saponaria* Molina, una de las dos especies de *Quillajaceae* que existe. El término “*Quillaja*” deriva del mapuche *quillay* o *küllay* que significa “lavar”. Los especímenes de *Q. saponaria* son nativos de la región central de Chile, concretamente entre las latitudes 30° S y 38° S⁹¹. Son árboles perennes, de 15 a 20 metros de altura, con la corteza color gris ceniza. Tienen hojas de color verde lustroso claro, alternas, glabras, de ápice agudo y base obtusa, con los bordes casi enteros con 4-8 dientes. La etapa de floración es de octubre a enero, y las flores

son hermafroditas, pequeñas con forma estrellada, de color blanco y amarillo, con 5 pétalos, 5 sépalos, 10 estambres y 5 ovarios. A partir del néctar y polen de estas flores, las abejas producen la “miel de Quillay”, una de las más cotizadas de Chile. Sus frutos pentadentados se asemejan al anís estrellado, y en su interior contienen semillas aladas⁹².

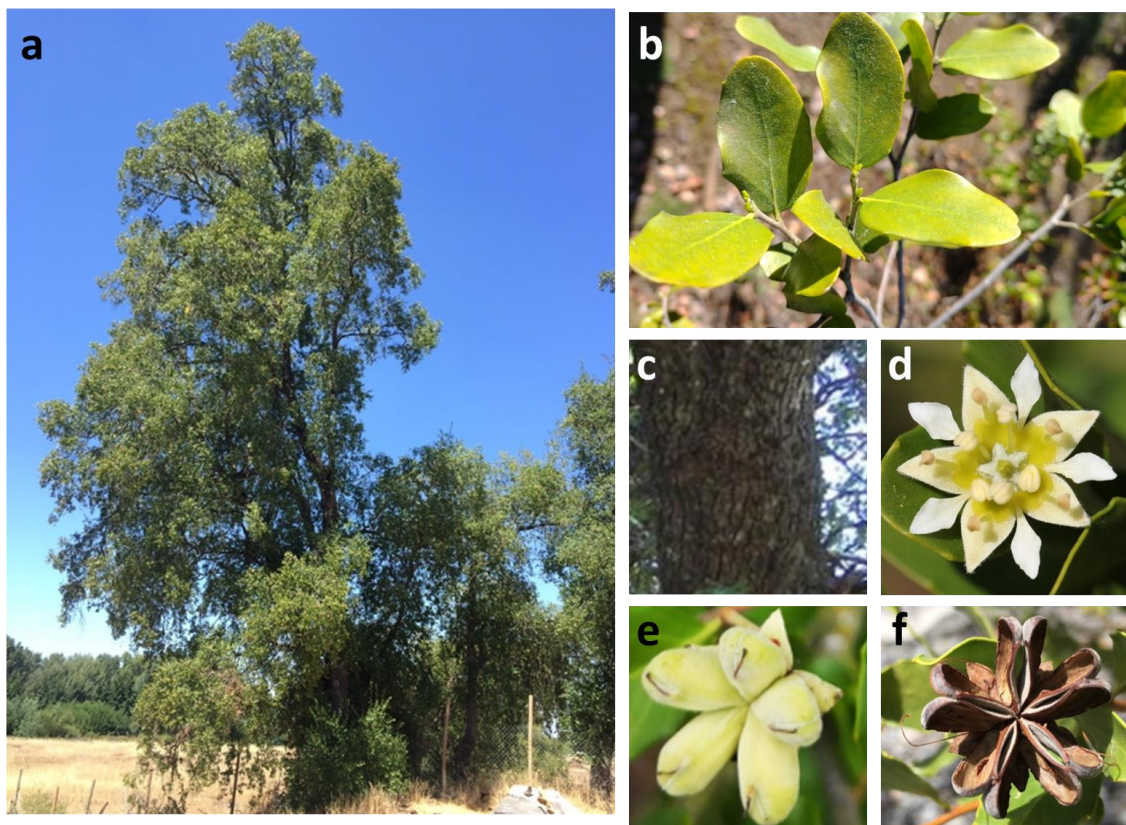


Figura 6. Fotos de *Quillaja saponaria*. Se muestra un árbol de *Q. saponaria* (a). Además se muestran las hojas (b), el tronco (c), una flor (d), el fruto inmaduro (e) y el fruto seco (f) de esta especie. Las imágenes fueron obtenidas del repositorio https://ecuador.inaturalist.org/taxa/181934-Quillaja-saponaria/browse_photos.

Los pueblos originarios de Chile, entre los que se encuentran los mapuches, han utilizado las propiedades de este árbol desde la antigüedad en su medicina tradicional, ya sea como expectorante en infecciones respiratorias, para tratar dolencias reumáticas o contra las enfermedades intestinales. Además, lo empleaban como jabón. El Abad jesuita Juan Ignacio Molina, un científico naturalista nacido en lo que hoy conocemos como Chile, que fue quien describió este árbol y realizó su clasificación taxonómica, en su tratado “*Ensayo sobre la historia natural de Chile*” (1782) describió a los habitantes de los pueblos originarios como muy limpios, ya que detalló que “no se ve nunca ni una mancha de suciedad en sus ropas” (traducción libre)⁹³, lo cual se cree que es debido al uso de la corteza de *Q. saponaria* como jabón⁹⁴.

Las saponinas de *Q. saponaria* se han utilizado industrialmente desde comienzos de 1900 hasta la actualidad en la industria alimenticia, cosmética, e incluso durante la II Guerra Mundial en lociones para limpiar lentes de tareas de vigilancia y como reactivos para revelado de fotografías, constituyendo el 80% del mercado mundial de saponinas para uso industrial⁹⁵.

Sin embargo, no fue hasta la década de 1970 cuando Dalsgaard obtuvo un extracto enriquecido con saponinas *Q. saponaria* al que denominó QuilA^{®96}, y demostró que tenía capacidad adyuvante en una vacuna contra la aftosa en modelo de cobayo y luego en bovinos⁹⁶. Este extracto es actualmente comercializado y utilizado como adyuvante en vacunas veterinarias.

Desde entonces, a pesar de la complejidad de la estructura de las saponinas, y que en los extractos se obtienen mezclas de ellas, se ha logrado optimizar los métodos de extracción y purificación, y se ha logrado identificar y aislar varios compuestos⁹⁷⁻⁹⁹. Sin embargo, los extractos con mezclas de saponinas presentan dos grandes desventajas para ser utilizadas en salud humana. La primera es que son mezclas complejas obtenidas a partir de una fuente natural, como son los bosques nativos, por lo que asegurar su reproducibilidad es difícil. Por otro lado, al ser mezclas complejas de moléculas que a su vez son complejas, no se conoce con exactitud todos los componentes. Por último, y no menos importante, las saponinas por su estructura generan poros en las membranas celulares, por lo que presentan una alta toxicidad. Por esta razón, hasta hace relativamente poco tiempo, el uso de las saponinas como adyuvante de vacunas estaba restringido únicamente a vacunas veterinarias. Sin embargo, en 1991 Kensil y colaboradores lograron identificar 10 fracciones de saponinas mediante RP-HPLC a partir de un extracto acuoso de *Q. saponaria*^{97,100}. Entre las fracciones encontradas, QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 fueron las que mostraron mayor capacidad adyuvante. La fracción QS-18, aunque de mayor abundancia, mostró altos niveles de toxicidad en modelo murino. Las fracciones QS-7 y QS-21, mostraron buena capacidad adyuvante, con mucha menor toxicidad. Dado que QS-21 era más abundante, se continuó estudiando su capacidad adyuvante^{97,100,101}.

QS-21 es una mezcla de dos isómeros, cada uno de los cuales es un glicósido triterpénico bidesmosídico acilado en posiciones 3 y 28, cuya fórmula molecular es $C_{92}O_{46}H_{148}$, y tiene un peso molecular de 1,99 kDa¹⁰² (Figura 7). Se ha descrito como uno de los adyuvantes ampliamente utilizados más potentes que existen^{100,103-106}. En este sentido, se demostró que era capaz de promover una potente respuesta humoral balanceada, promoviendo altos niveles de IgG1 e IgG2a antígeno-específicos^{97,102,107}, y a la vez promover potentes respuestas de linfocitos T CD8⁺ en ratones^{97,100,105-108}. También se demostró que QS-21 promueve la producción de CTL, y la inducción de las citoquinas de fenotipo Th1, tales como IL-2 e IFN- γ , y a la vez que potentes títulos de anticuerpos IgG2a. Además, se demostró que era más potente que otros adyuvantes en la promoción de respuestas celulares antígeno-específicas^{97,103}. Actualmente se utiliza como adyuvante en una vacuna a subunidades recombinante contra el retrovirus de la leucemia felina (FeLV)^{100,109}. Sin embargo, mantenía altos niveles de toxicidad en humanos, por lo que se buscaron alternativas para potenciar su uso. En este sentido GSK desarrolló el adyuvante AS01, que en términos generales consiste en la combinación de QS-21 con MPL en liposomas. De esta manera se logró poder utilizar el potencial adyuvante de QS-21 y enmascarar sus efectos adversos. Este adyuvante es uno de los componentes de las vacunas licenciadas contra malaria (MosquirixTM)¹¹⁰ y Herpes Zoster (ShingrixTM)¹¹¹. Además, QS-21 formulado en el adyuvante Matrix M es parte de la vacuna licenciada contra Covid-19 de Novavax (NVX-CoV2373)¹¹². La vacuna a subunidades contra tuberculosis que más ha avanzado en los ensayos clínicos también contiene AS01 como adyuvante, y ha completado la fase II satisfactoriamente^{113,114}.

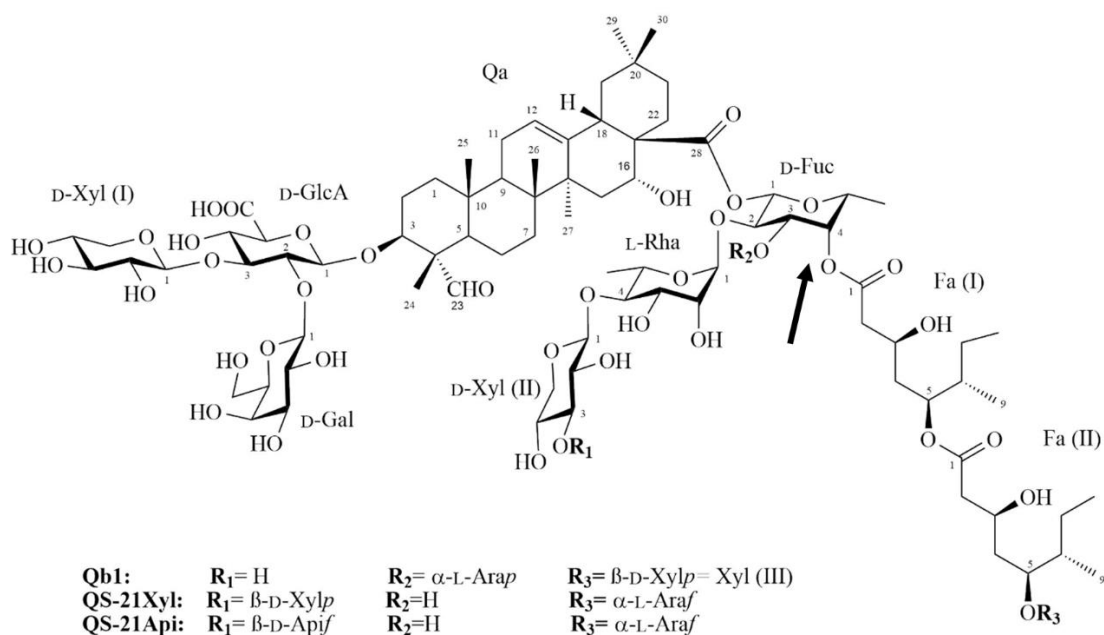


Figura 7. Estructura química de QS-21. La flecha señala la localización de la cadena lateral de acilo graso en el residuo de fucosa responsable de desencadenar una respuesta de tipo Th1 (como se explicará más adelante). Adaptado de Wallace et. al. 2022¹¹⁵.

A pesar de estas aplicaciones exitosas, se está evidenciando un problema de sostenibilidad de los bosques, que además de los nocivos efectos ambientales, también supone fallas en la cadena de suministro de la materia prima. En 2015 se estimaba que la biomasa de árboles de *Q. saponaria* requerida para 2019-2020 (sin tener en cuenta el desarrollo de la vacuna contra Covid-19, que incrementaría sustancialmente la demanda) era de 40.000 a 48.000 toneladas⁹¹. Dado que las fracciones se obtienen de la corteza de los árboles adultos (de varias décadas de edad) de *Q. saponaria*, la sobreexplotación derivó en un drástico descenso del área de estos bosques, con un fuerte impacto ambiental. Por esta razón, se establecieron regulaciones por parte del gobierno de Chile y métodos para realizar la extracción de la biomasa sin comprometer los bosques nativos¹¹⁶. En general las hojas no se utilizaban para la extracción de saponinas, debido a que en *Q. saponaria* contienen menor porcentaje de saponinas, y además, los métodos de extracción no estaban pensados para este material que contiene sustancias distintas a la corteza, tales como clorofila. En vista de la alta demanda y el alto impacto ambiental, se está investigando en métodos alternativos que permitan potenciar la obtención de estos metabolitos⁹¹, entre los que se incluyen la obtención de saponinas sintéticas^{117,118}.

1.3.2. Saponinas de *Quillaja brasiliensis*

Desde hace un poco más de una década se ha comenzado a estudiar el potencial adyuvante de las saponinas obtenidas de los extractos foliares del árbol *Quillaja brasiliensis*, la otra especie del género *Quillajacea*. Este árbol es nativo del noreste de Argentina, este de Paraguay, norte de Uruguay y sur de Brasil.

Es un árbol de gran altura, típicamente de 8-12 metros, pero puede alcanzar los 15-20 metros (Figura 8 a). El follaje es perenne, persistente, verdoso. Las hojas son simples, alternas, glabras, lanceoladas, paucidentadas, con ápice agudo y base cuneada, en general de 1,5 a 3 cm de ancho

y 4 a 8 cm de largo (Figura 8 b). El tronco es oscuro con corteza de color gris oscuro o hasta negro, con fuertes hendiduras longitudinales (Figura 8 c). Las flores se agrupan en inflorescencias paucifloras, axilares con flores masculinas y femeninas en el mismo tallo (son plantas monoicas), actinomorfas, con el cáliz verde amarillento de 5 sépalos, y una corola de 5 pétalos mucho más angostos que los sépalos (Figura 8 d). Florece en primavera-verano. El fruto es muy característico. Está formado por 5 folículos unidos solo por su base, de dehiscencia longitudinal, cada uno con una gran cantidad de semillas muy tenues. Son frutos leñosos, de color gris al madurar (Figura 8 e). Caen del árbol una vez que maduran las semillas. Sus hojas, ramas y corteza tienen altas concentraciones de saponinas, que en contacto con el agua producen abundante espuma y se han utilizado en la limpieza^{119–121}.

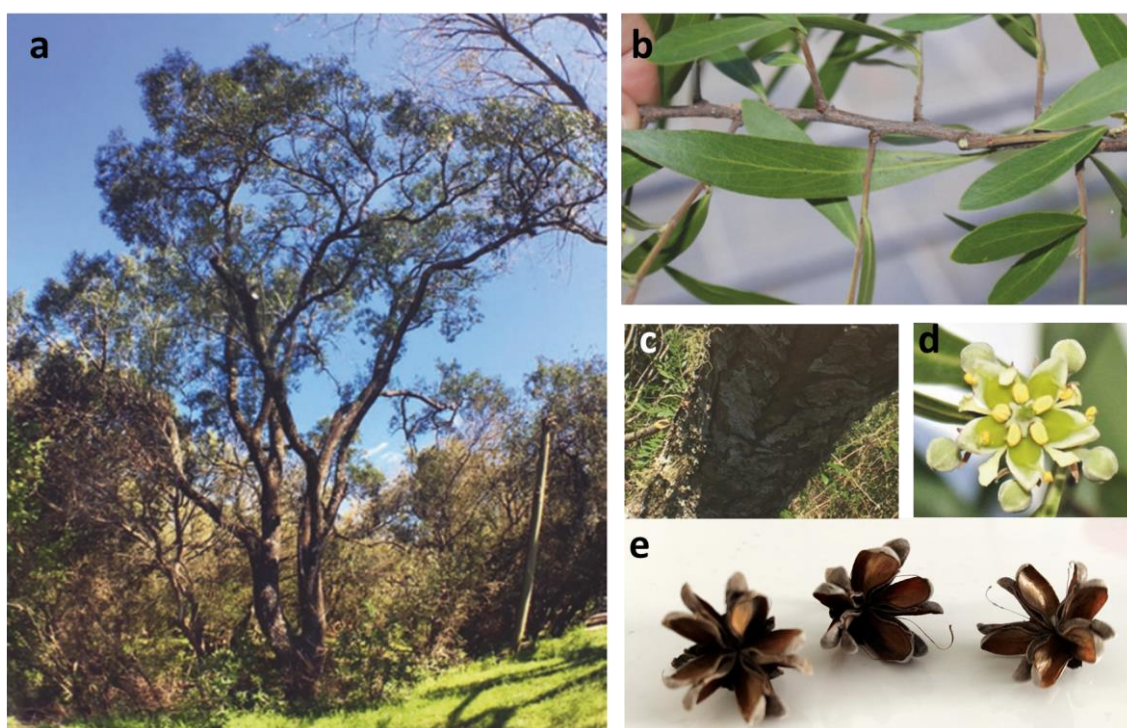


Figura 8. Fotos de *Quillaja brasiliensis*. Se muestra un árbol de *Q. brasiliensis* localizado en Valle Edén, Tacuarembó, Uruguay (a). Además se muestran las hojas (b), el tronco (c), una flor (d), y los frutos ya secos (e) de esta especie. a-d fueron adaptadas de Ferreira et. al. 2021⁹². La foto e es de mi autoría.

A partir de los extractos foliares de *Q. brasiliensis* se han obtenido extractos acuosos (AE) y a partir de éstos distintas fracciones de saponinas, que se han denominado Fracción b (Fb)^{115,122,123}, QB80 y QB90^{124,125}, que han demostrado contener saponinas bioactivas con capacidad adyuvante. Su estructura se ha comenzado a elucidar recientemente, aunque ninguna de las fracciones mencionadas previamente comprende a un solo tipo de moléculas de saponinas, sino que son una mezcla compleja de éstas. Previamente, mediante distintas variantes de la espectrometría de masas se determinó que Fb es una mezcla de 27 saponinas bidesmosídicas, y que tienen 4 tipos de agliconas diferentes¹²². Los mismos autores identificaron además 75 saponinas, 21 de los extractos foliares y 54 de la corteza de *Q. brasiliensis*, algunas de las cuales no habían sido reportadas en las fracciones de *Q. saponaria*¹²³. Recientemente, gracias a las técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas se identificaron dos compuestos en Fb, uno de los cuales, denominado Qb1 es un isómero de QS-21¹¹⁵.

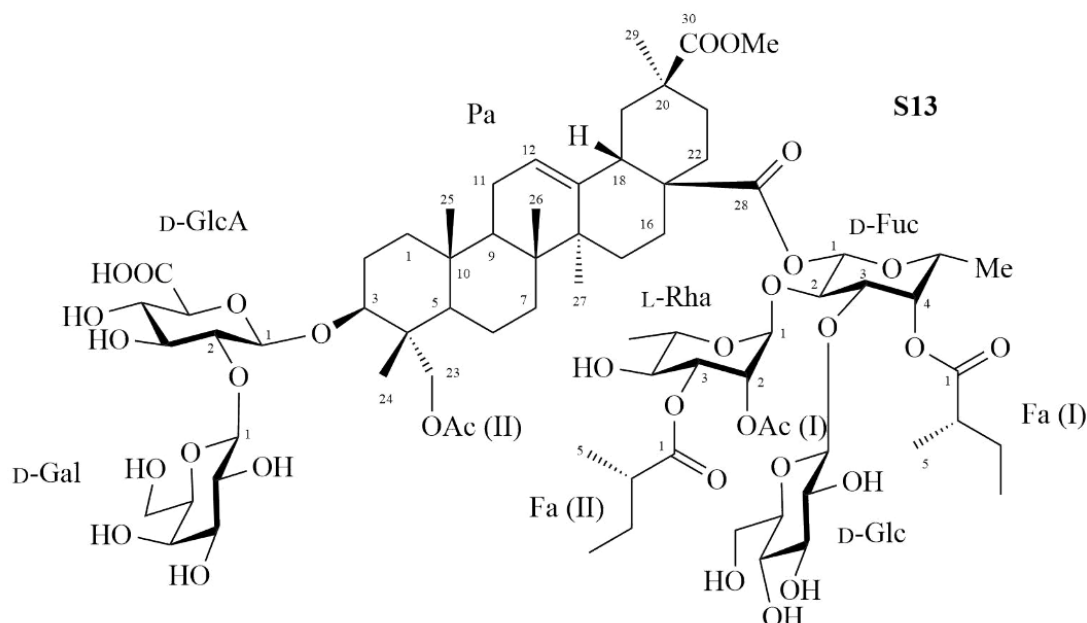


Figura 9. Estructura química de S13, una saponina obtenida de *Q. brasiliensis*. Adaptado de Wallace et. al. 2022¹¹⁵.

A pesar de que aún no se conoce la estructura de todas las saponinas que conforman las fracciones de *Q. brasiliensis*, se ha evaluado su capacidad adyuvante de varias fracciones en vacunas experimentales contra distintos patógenos virales tales como herpesvirus tipo 1¹²⁶ y tipo 5¹²⁷, poliovirus¹²⁸, rabia¹²⁹, virus de la diarrea bovina (BVDV)¹³⁰ y Zika^{131,132} en modelos murinos. En todos los casos se observó que las vacunas experimentales conteniendo alguna de estas fracciones como adyuvante promovían respuestas similares a las promovidas por QuilA®, pero presentaban menor toxicidad. En términos de la respuesta inmune desencadenada, se ha evidenciado que son capaces de promover potentes respuestas humorales y celulares con fenotipo mixto Th1/Th2, e incluyendo la generación de respuesta de CTL y la secreción de citoquinas proinflamatorias con perfil Th1 por parte de éstos¹³³.

1.3.3. Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs)

Una gran desventaja que tienen las saponinas es que tienen la capacidad de causar lisis en las células eucariotas, debido a que su aglicona interacciona con el colesterol de las membranas de éstas, causando poros que derivan en la lisis celular¹³⁴. Una de las estrategias para evitar este efecto, pero mantener la capacidad inmunoestimulante de las saponinas consiste en formularlas en complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), nanopartículas (NPs) de aproximadamente 40 nm y de forma de buckminsterfullereno o tipo caja, descritas por Morein y colaboradores en 1984¹³⁵ (Figura 10). Estas NP se forman de manera espontánea al combinar por distintos métodos colesterol, fosfatidilcolina, saponinas y el antígeno vacunal. Cuando se formulan sin el antígeno vacunal, se denominan ISCOMATRIX o ISCOM-matrices (IMX) y presentan las mismas características que los ISCOMs, pero tienen la ventaja de poder ser combinadas con diferentes antígenos por mezcla simple previo a la vacunación, y generando el mismo efecto que los ISCOMs. Los ISCOMs o IMX formulados con saponinas de *Q. saponaria*, forman parte de vacunas licenciadas para animales, como en el caso de la vacuna de influenza equina Equip F® (Zoetis), en la que se utiliza QuilA®, y también están siendo evaluados en ensayos clínicos en vacunas

para humanos contra influenza, HPV y el virus de la Hepatitis C (HCV). Los ISCOMs (o IMX) son estables a 4 °C.

Además de eliminar la capacidad hemolítica de las saponinas, los ISCOMs (o IMX) presentan la ventaja de que pueden ser considerados como vehículo y como inmunoestimulantes al mismo tiempo, lo que los vuelve más inmunogénicos que las saponinas que contienen¹³⁶. Debido a su naturaleza particulada, y a su tamaño (aproximadamente de 40 nm), estas nanopartículas son internalizadas por las APCs, particularmente por las células dendríticas de forma muy eficiente. Gracias a su estructura, pueden conseguir una liberación eficaz del antígeno en las células, promoviendo la presentación cruzada de antígenos¹³⁷, y dando como resultado la inducción de respuestas inmunes humorales y celulares duraderas tanto a nivel sistémico como de mucosas^{136,138-140}. Los ISCOMs combinan las ventajas de un sistema de transporte particulado con la presencia de un compuesto estimulante del sistema inmune como son las saponinas, dando como consecuencia productos más inmunogénicos que otros sistemas coloidales tales como liposomas o micelas proteicas^{141,142}. Las dendríticas que internalizan estas NPs, se activarán y migrarán al dLN, donde realizarán la presentación de antígeno a las células B y T. Además, por su tamaño, estas NPs pueden alcanzar el dLN a través del fluido linfático, y allí serán internalizadas por las células dendríticas y otras APC residentes del dLN, lo que provoca, junto a la presentación de las APC residentes de tejido, “dos oleadas de presentación” en el dLN. De esta manera van a promover una activación de la respuesta inmune innata muy potente, que luego derivará en una potente respuesta adaptativa antígeno-específica de larga duración, que incluye una respuesta celular balanceada Th1/Th2, y la generación de linfocitos T citotóxicos^{136,138,141,143,144}.

Aunque clásicamente los ISCOMs se formulan con saponinas de *Q. saponaria*, nuestro grupo logró exitosamente la formulación de ISCOMs a partir de la fracción QB90 de *Q. brasiliensis*¹³⁸.

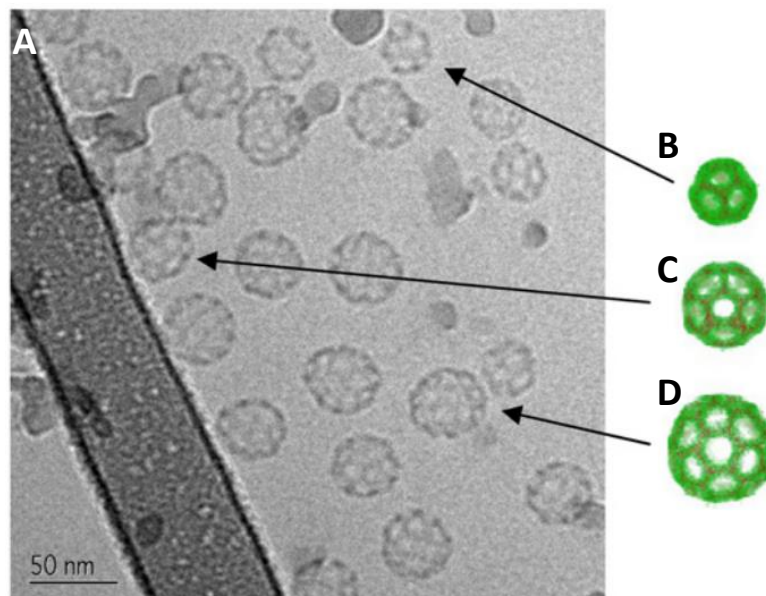


Figura 10. Estructura de los ISCOMs. Se muestra una crio-micrografía electrónica de transmisión de los ISCOMs, en donde se evidencia su estructura tipo caja y su tamaño de aproximadamente 40 nm (A). La barra de escala en extremo inferior izquierdo corresponde a 50 nm. Pedersen y colaboradores definieron distintas estructuras mediante la técnica de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), a las que denominaron estructura icosaédrica (B), estructura de pelota de tenis (C) y estructura de pelota de fútbol (D). Adaptado de Pedersen et. al. 2012¹⁴⁵.

1.3.4. Mecanismo de acción de adyuvantes basados en saponinas (SBAs)

Como sucede con varios adyuvantes, a pesar de haber sido utilizadas como adyuvantes de vacunas durante décadas, aún no se termina de comprender completamente como es el mecanismo de acción de los adyuvantes basados en saponinas (SBAs). Sin embargo, se han empezado a elucidar algunos mecanismos de los mismos. Dado que las saponinas de *Q. saponaria* son las que más se han utilizado y están disponibles comercialmente, la mayoría de los estudios se centran en ellas.

Estudios de la correlación estructura-función realizados mediante el agregado o clivado de ciertos sustituyentes lograron determinar que, en el caso de QT-0101 (una saponina de *Q. saponaria*), el estado de acilación de su único residuo de fucosa es determinante para que esta saponina pueda desencadenar una respuesta de fenotipo mixto Th1/Th2 o únicamente una respuesta de fenotipo Th2¹⁴⁶. Mientras que las saponinas con los residuos de fucosa acilados promueven una respuesta mixta Th1/Th2, la defucosilación (es decir, la remoción del ácido graso del residuo de fucosa, y por ende, la exposición del residuo de fucosa), provoca que la saponina promueva una respuesta inmune de fenotipo Th2. La remoción del oligosacárido de fucosa deacilado reestablece la capacidad de la saponina de promover una respuesta mixta Th1/Th2, dejando en claro el rol del residuo de fucosa y su estado de acilación en la polarización hacia el fenotipo Th2¹⁴⁷. Estudios previos con glicanos fucosilados de helmintos, demostraron que éstos se unen al receptor de lectinas de tipo C DC-SIGN de las DCs, con alta flexibilidad en su interacción, lo que resulta en la polarización de la respuesta hacia el fenotipo Th2¹⁴⁸. Este efecto ocurriría debido a que los ácidos grasos al unirse al residuo de fucosa (en la reacción de acilación) impiden estéricamente la interacción de la molécula con DC-SIGN, lo que resulta en una polarización de la respuesta hacia el fenotipo Th2, e inhibiendo una respuesta de fenotipo Th1. Aunque la desacilación de la fucosa en las saponinas pueda verse como una desventaja para su uso como adyuvantes en formulaciones que requieran desencadenar una respuesta de tipo Th1, el hecho de que se puedan manipular para inhibir una respuesta de este fenotipo puede ser útil en casos vacunas que requieran únicamente una respuesta tipo Th2, como en las enfermedades priónicas, o enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Alzheimer¹⁴⁹.

Aparte de la interacción con DC-SIGN, no se ha demostrado interacción con TLRs por parte de IMX de *Q. saponaria*, sino que se ha reportado que su interacción es independiente de TLRs, pero dependiente de la molécula adaptadora MyD88, y que esta interacción es necesaria para promover la activación de la respuesta innata y adaptativa¹³⁷, y en particular para promover el reclutamiento de células dendríticas y neutrófilos¹⁵⁰.

En particular, se ha reportado que ISCOMATRIX formulados con saponinas comerciales (extraídas de *Q. saponaria*), como también sucede con otros adyuvantes particulados, tales como las sales de aluminio, activan el inflammasoma canónico NLRP3 en APCs¹⁵¹⁻¹⁵³ lo que deriva en la producción de IL-1 β e IL-18. Sin embargo, también se demostró que es la vía de IL-18, y no de IL-1 β , la necesaria para promover respuestas innatas tempranas, y luego una respuesta adaptativa celular¹⁵¹. Asimismo, se demostró que las APCs expuestas directamente a los IMX sufrieron muerte celular mediada por endosomas, lo que daría lugar al inicio de la respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación¹⁵¹.

Además de su estimulación a las DCs, también se ha reportado que luego de la inoculación intramuscular QS-21 se acumula en los macrófagos CD169⁺ residentes del dLN, donde genera una respuesta innata local en modelo murino. La depleción de estos macrófagos, impidió el reclutamiento celular al dLN, así como también la maduración de las DCs, y la respuesta celular y humoral frente a los antígenos co-administrados. Además se demostró que son las DCs más que los macrófagos residentes del dLN las células responsables de activar a las células T luego de la inoculación de QS-21¹⁵⁰. Los mismos autores demostraron además que QS-21 era capaz de generar la proliferación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ antígeno-específicas polifuncionales, que eran capaces de secretar en simultáneo IL-2, IFN- γ y TNF, lo que indica una marcada respuesta con fenotipo Th1¹⁵⁰. También se demostró que QS-21 induce la activación del complejo inflamasoma NLRP3, y que la activación de Caspasa-1/11 en el ensamblado de éste está involucrada en el reclutamiento de células T CD4⁺ y T CD8⁺, pero no incide en la respuesta humoral¹⁵⁰. La activación de Caspasa-1 desencadena piroptosis gracias a la activación del inflamasoma, con la consecuente liberación de DAMPs, entre los que se encuentra HMGB1, que es capaz de activar la respuesta innata de manera dependiente de MyD88 y a través de TLR4 y RAGE¹⁵⁴. Por esta razón, se trató a los ratones vacunados con QS-21 y un antígeno con un inhibidor de la interacción de HMGB1 y el co-receptor de TLR4 (el factor de diferenciación mieloide 2, MD-2¹⁵⁵, y se observó una disminución en la frecuencia células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicas productoras de citoquinas, pero no se detectaron cambios en la polifuncionalidad de éstas, ni en la respuesta humoral. Estos estudios demostraron que la señalización HMGB1-TLR4 contribuye parcialmente en la capacidad de QS-21 en inducir una respuesta de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicas¹⁵⁰.

Asimismo, se ha reportado que QS-21 estimula directamente a las DCs derivadas de monocitos (moDCs). En estas células, esta molécula es internalizada mediante la endocitosis dependiente de colesterol, y luego promueve la desestabilización endosomal y la activación de la tirosin-protein quinasa Syk, lo que deriva en la activación de un programa de transcripción pro-inflamatorio¹⁵⁶.

Por último y no menos importante, los SBAs de *Q. saponaria*, tanto de forma soluble como en ISCOMs, tienen la capacidad de inducir la presentación cruzada por parte de las DCs, y esto es lo que promueve la potente respuesta de linfocitos T CD8⁺. En este sentido se ha demostrado que la presentación cruzada depende de la formación de *lipid bodies* (LB)¹⁵⁷. Recientemente se ha demostrado que los SBAs activan la vía de la quinasa del Retículo Endoplasmático tipo PRK (PERK), y que la presentación cruzada por parte de las DCs depende de esta vía¹⁵⁸. Además, se demostró que la respuesta a los SBAs, la formación de los LB y la activación de la vía PERK son específicos para las DCs murinas identificadas como MHCII^{lo}CD11b^{hi}, que además son las células que más realizan la presentación cruzada de antígeno en presencia de SBAs¹⁵⁸. Como ha sido ampliamente postulado, es altamente probable que la capacidad adyuvante de estos compuestos no se deba a un mecanismo puntual, sino a la sinergia de múltiples mecanismos que confluyen en desencadenar varios mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa^{159,160}. Sin embargo, conocer estos mecanismos es crucial para poder identificar potenciales efectos adversos si los hubiera, y además poder evidenciar qué moléculas con qué estructuras de las fracciones de saponinas serían necesarias utilizar como adyuvantes.

1.4. Propóleos de *Apis mellifera*

El propóleo es otro compuesto natural que ha demostrado poseer capacidad adyuvante. Es un material resinoso producido por las abejas *Apis mellifera* mediante digestión enzimática en su cavidad oral de exudados de los brotes y cortezas de la flora. Las abejas lo utilizan principalmente para cerrar agujeros y grietas en su colmena, así como también para cubrir los cuerpos de animales invasores y evitar que éstos se descompongan. Esta sustancia, protege a la colmena de diversas enfermedades gracias a sus propiedades antisépticas y antimicrobianas. Como resultado de la variabilidad de la flora que tienen disponible las abejas, su composición varía entre zonas geográficas y estaciones climáticas. Por esta razón, el término “propóleo” no define a la sustancia químicamente. Es un producto químicamente complejo, en general se compone de resinas, bálsamos, cera, aceites esenciales y aromáticos, granos de polen, entre otras sustancias. Se han identificado más de 300 componentes en muestras de propóleos^{161,162}, y se ha reportado sinergia de la actividad biológica entre los componentes presentes¹⁶³. Estudios recientes han demostrado que propóleos de diversas regiones presentan actividad adyuvante¹⁶³⁻¹⁷⁵. Estos estudios indican que los compuestos fenólicos y flavonoides (componentes del extracto etanólico) del propóleo aumentan la actividad leucocitaria, fagocítica y linfocitaria, así como también el título de anticuerpos neutralizantes. Asimismo, promueven respuestas inmunes más duraderas y activan la inmunidad innata^{164,176}. Por otro lado, no tiene efectos secundarios asociados cuando se administra a ratas, ratones y humanos^{161,177,178}. A pesar de las ventajas que presentan, algunos de los compuestos de la fracción etanólica del propóleo pueden ser inestables, lo que afecta la función de los mismos, y dificulta su uso como adyuvantes. Además, al ser insolubles en medio acuoso, su uso en formulaciones vacunales se ha visto restringido. Para contrarrestar estas desventajas, estudios previos incluyeron fracciones etanólicas de propóleos en liposomas, mediante el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹, y estudiaron su capacidad adyuvante^{168,173,180}. Estos estudios sugieren que las fracciones etanólicas de distintos propóleos son estabilizadas satisfactoriamente por los liposomas, a la vez que son capaces de promover mayores respuestas humorales y celulares que los liposomas vacíos o que las fracciones de propóleo solas^{168,173}. Asimismo, detectaron que las formulaciones de liposomas con fracciones de propóleos promovían la producción de IL-2 e IFN- γ , indicando que estarían modulando una respuesta de tipo Th1¹⁸⁰. En Uruguay, se han estudiado los propóleos producidos por abejas productoras de miel (*A. mellifera*) y se ha reportado que tienen actividad bactericida y antioxidante, así como también la capacidad de activar sistemas de protección endógenos a nivel celular¹⁸¹. Además, son ricos en flavonoides y compuestos fenólicos, similares a los propóleos europeos y chinos (estos últimos con probada actividad adyuvante) pero diferentes de los del norte de Brasil¹⁸²⁻¹⁸⁵. No obstante, no hemos encontrado estudios sobre la actividad adyuvante de los propóleos uruguayos. En este trabajo nos proponemos combinar los extractos etanólicos de propóleos (EEP) obtenidos de productores apícolas del oeste del país (Departamento de Soriano) junto con las saponinas de *Q. brasiliensis*, en NPs tipo ISCOMs o IMX, y evaluar su capacidad adyuvante, como estrategia para estudiar la sinergia entre estos dos componentes obtenidos de nuestra fauna y flora nativa.

1.5. Modelos infecciosos

Dado que para evaluar la capacidad adyuvante de un compuesto es necesario poder evidenciar si éste es capaz de potenciar la respuesta inmune adaptativa antígeno-específica, se trabajó con dos modelos de infección, que son muy dispares, pero ambos presentan la particularidad de que se necesita de la generación de una potente respuesta de tipo Th1 para lograr la protección de los individuos, y a la vez ambos son patógenos muy desafiantes para los que no hay vacuna (en el caso de *Fasciola hepatica*) o para el que las vacunas existentes deben ser mejoradas con el fin de lograr aumentar la protección a las personas y/o animales, o proteger a personas de mayor edad o inmunocomprometidas, como es el caso de Influenza.

1.5.1. *Fasciola hepatica*

Existen dos especies parásitas de gusanos planos del género *Fasciola* (filo Plathelminthes, del griego *Platys* que significa plano y *helmins* que significa gusano; clase Trematoda): *F. gigantica*, que se desarrolla en climas tropicales y únicamente en África y Asia, y *F. hepatica*, que se desarrolla principalmente en climas templados, y constituye el parásito de mayor distribución geográfica a nivel mundial¹⁸⁶. Este tremátodo parasita los canales y la vesícula biliar de mamíferos herbívoros y omnívoros, incluido el ser humano, causando fasciolosis, una zoonosis transmitida por plantas que se caracteriza por causar severo daño hepato-biliar. En humanos esta afección históricamente tenía baja incidencia, pero en las últimas décadas se ha visto un incremento de ésta, por lo que ha recobrado cierto interés en salud pública, aunque continúa siendo una enfermedad desatendida¹⁸⁷. Se estima que entre 2,6 y 17 millones de personas están infectadas con *Fasciola* spp. a nivel mundial, y 180 millones están en riesgo de ser infectadas^{188,189}. Además, es considerada una de las parasitosis más relevantes de los rumiantes, principalmente del ganado bovino, ovino y caprino, ya que se ha estimado que hay 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos expuestos a ser infectados¹⁹⁰, y que las pérdidas económicas en la producción agroindustrial causadas por este parásito asciende a 3.000 millones de dólares anuales a nivel mundial¹⁹¹. En Uruguay, *F. hepática* también se conoce como *sobaypé* o *saguaypé* que en guaraní significa “gusano chato o plano”, y presenta una baja incidencia en humanos, pero una muy alta incidencia en ganado ovino y bovino distribuida a lo largo y ancho del país. En este sentido, se calcula que la incidencia en ganado bovino es del 33,9 %, y se ha determinado que anualmente se pierden 6 millones de dólares anuales sólo por decomiso de hígados de animales infectados en frigoríficos¹⁹², a lo que habría que agregarle el costo adicional de la baja en la producción de los animales infectados, el costo de los tratamientos, y el costo de la muerte de animales por esta infección. Los animales con fasciolosis presentan retardo en el crecimiento, disminución de la producción de leche y carne, infertilidad, anemia, abortos e incluso muerte^{193,194}.

Los individuos de *F. hepatica* en estado adulto son gusanos planos con forma lanceolada con el extremo anterior saliente en forma de cono, con un tamaño típico de 2 a 3 cm de largo por 1 cm de ancho y apariencia carnosa. En estadio adulto es un parásito hematófago con el cuerpo de color beige-rosa, aunque adquiere tonalidades de marrón debido a la presencia de bilis y sangre en el intestino. Presenta dos ventosas en la parte anterior, la más grande en el lado ventral que permite que el individuo se adhiera a la pared del tracto biliar del hospedero definitivo, mientras con la segunda ventosa, de menor tamaño, puede nutrirse de la bilis de éste¹⁹⁵. El cuerpo está recubierto por el tegumento, formado por un sincitio delimitado por una membrana doble con

microvellosidades. Por debajo del sincitio, tiene una membrana basal junto a una capa de fibras musculares que aseguran la locomoción del tremátodo, y el parénquima. En éste se encuentran los sistemas digestivo, excretor y nervioso. El sistema digestivo es altamente desarrollado y ramificado, y es responsable de la distribución de nutrientes para todas las células del organismo, ya que *F. hepatica* carece de sistema circulatorio¹⁹⁵.

Como se muestra en la Figura 11, el ciclo de vida de este parásito es complejo, ya que involucra distintos estadios y el pasaje por dos hospederos: uno intermediario (molusco) y uno definitivo (mamífero). Por esta razón se les denomina digenéticos o digenea¹⁹⁶. Son parásitos hermafroditas, y el ciclo comienza cuando un individuo adulto pone sus huevos ovalados en los conductos hepáticos o biliares de su hospedero definitivo. Los huevos sin embrionar llegan al intestino junto con la bilis, y son excretados al medio en las heces. Para que los huevos embrionen necesitan estar inmersos en agua dulce, en donde eclosionan dando origen al miracidio, la primera forma larvaria. Gracias a la presencia de una cilia, el miracidio nada libremente hasta lograr infectar al hospedero intermediario: un molusco de la familia *Lymnaeidae* (*Limnaea viatrix*, *Limnaea columella*, entre otras especies de caracoles)¹⁹⁷. En el interior del caracol, los miracidios dan lugar a las formas larvarias esporoquistes, redias y finalmente cercarias. Esta etapa, donde ocurre la reproducción asexual del parásito, se conoce como “expansión clonal”, ya que a partir de cada miracidio se producen entre 10 y 700 cercarias¹⁸⁷. Éstas tienen cuerpo redondeado y cola no bifurcada, lo que les permite nadar libremente hasta adherirse a distintas plantas, donde sufrirán cambios que derivarán en el enquistamiento en la forma de metacercarias¹⁹⁸, a la espera de ser ingeridas por el hospedero final: un mamífero. Las metacercarias constituyen la forma infectante de mamíferos de este parásito. El mecanismo de invasión y establecimiento en el hospedero definitivo se esquematiza en la Figura 12. Al ser ingeridas junto con las plantas, las metacercarias atraviesan el sistema digestivo y en el duodeno, pocos días después de la ingestión, y gracias a una serie de estímulos tales como concentración de CO₂, temperatura, presencia de sales biliares, condiciones reductoras y pH, ocurre el desenquistamiento, dando lugar a los “juveniles recientemente desenquistados” (NEJ, del inglés “*newly excysted juveniles*”). Los NEJ secretan catepsin-peptidasas junto a otras proteasas, y gracias a ellas logran atravesar el epitelio intestinal, alcanzar el peritoneo, y luego la cápsula hepática, para adherirse a los canales biliares, donde se alimentan de la bilis del hospedero y completan su desarrollo hasta el estado adulto, que en humanos demora entre 3 y 4 meses¹⁹⁷. La ingesta de berro (*Nasturtium officinale*) es la principal fuente de infección por este parásito en humanos. Los rumiantes y otros herbívoros se infectan al consumir pasturas contaminadas con metacercarias. Una vez que los tremátodos se desarrollan y alcanzan la madurez sexual, comienza la etapa de reproducción sexuada, donde cada individuo puede poner hasta 20.000 huevos por día. Estos huevos son relativamente grandes (entre 130-150 µm de largo por 63-90 µm de ancho), de color marrón, y contienen los miracidios inmaduros, que serán excretados en las heces del hospedero, dando lugar a la continuidad del ciclo de vida del parásito. Se ha reportado que en humanos *F. hepatica* en estadio adulto puede vivir hasta 13 años si no se aplican tratamientos antihelmínticos¹⁹⁹.

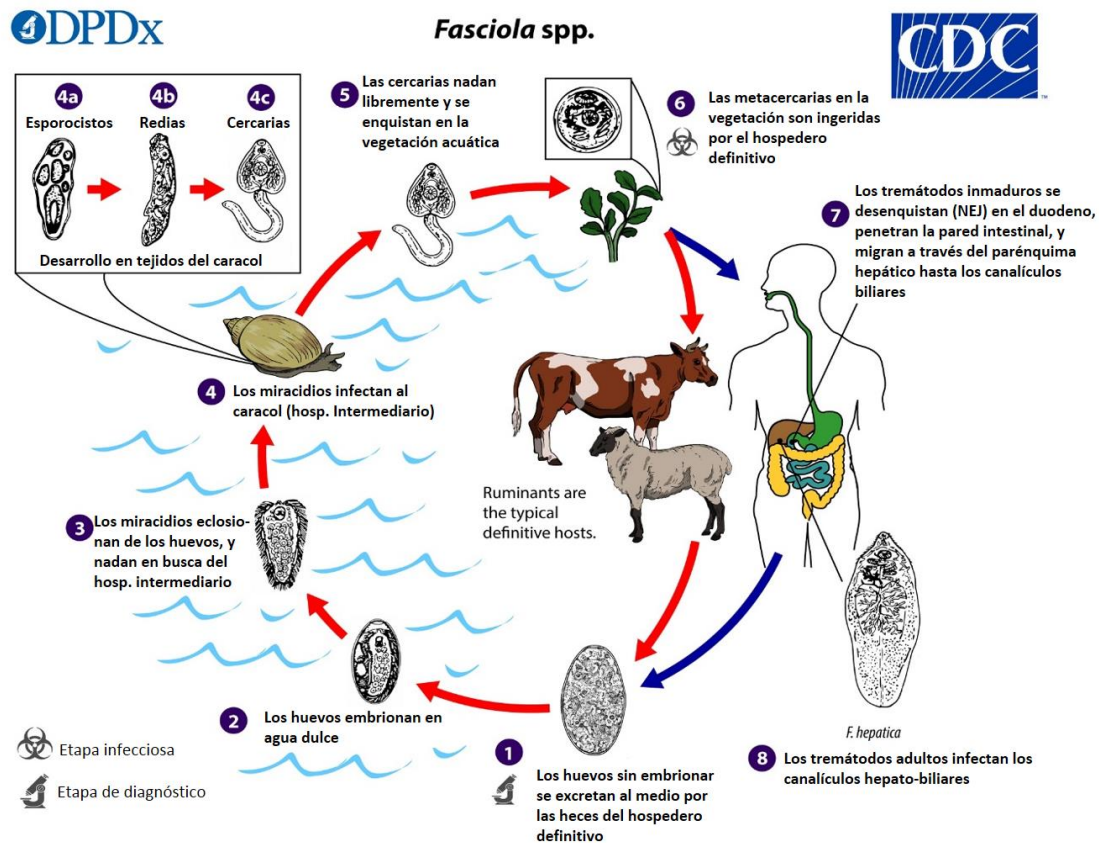


Figura 11. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*. Adaptado de CDC.

El daño tisular causado por los NEJ atravesando el parénquima hepático y los canalículos biliares contribuye en gran medida a la patogenicidad¹⁹⁵. Además, la constante alimentación de los parásitos con la hemoglobina del hospedero y la presencia de grandes individuos en los ductos biliares puede derivar en anemia, inflamación, colangitis (inflamación de los canalículos biliares) y obstrucción de éstos, e incluso en la disfunción del hígado. *F. hepatica* presenta una alta frecuencia de polimorfismos no sinónimos, lo que le ha permitido la adaptación e invasión de un amplio rango de hospederos²⁰⁰. Además, el parásito genera una amplia gama de moléculas de excreción-secreción (ES) que inducen cambios fisiológicos en el hospedero definitivo que le permiten establecerse en éste, tales como proteínas reguladoras, glicanos y micro ARNs (miARN)^{201,202}. Entre los ES, se destacan las catepsin-peptidasas ya mencionadas que le permiten la invasión a través del intestino, y en los ductos biliares la L-catepsina que es crítica para la digestión de la hemoglobina de la que se alimenta. Otras moléculas de ES tienen como objetivo la modulación del sistema inmune del hospedero hacia un fenotipo Th2 o regulador, logrando la evasión del sistema inmune del hospedero, y favoreciendo la supervivencia de los tremátodos.

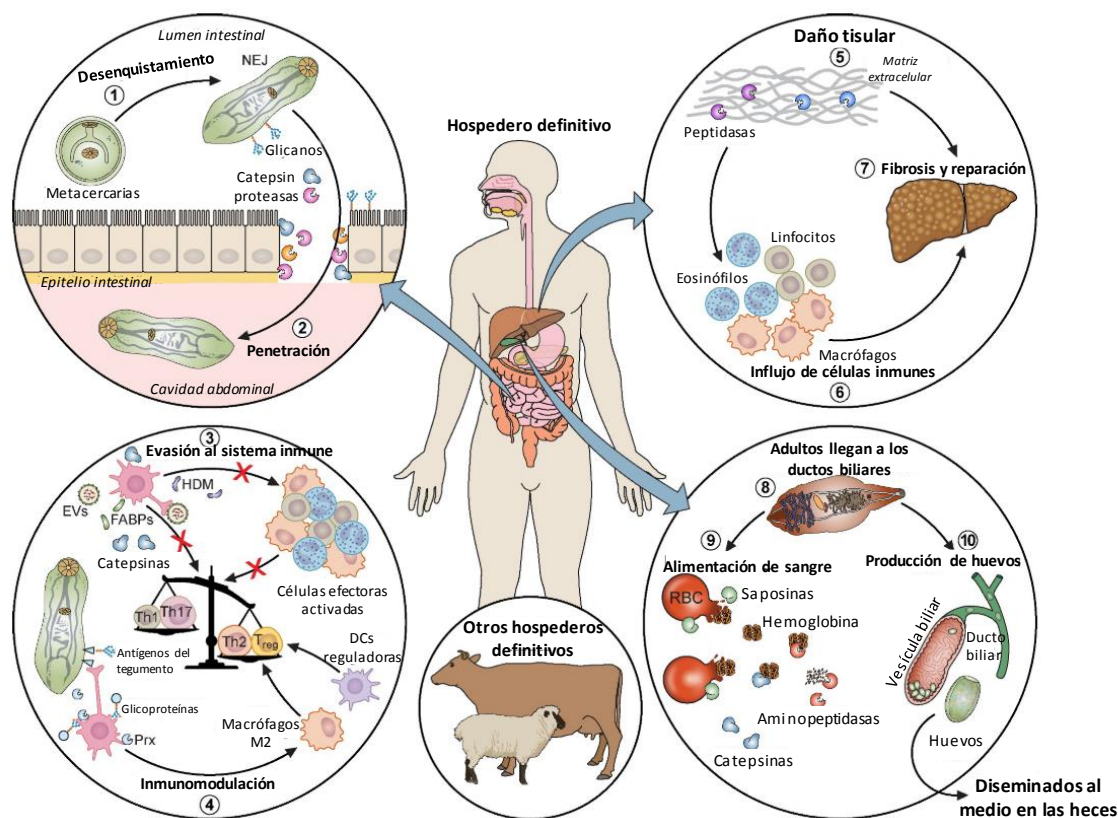


Figura 12. Mecanismo de invasión y establecimiento de *F. hepatica* en el hospedero definitivo. Las metacercarias se desenquistan en el duodeno (1), y los NEJ secretan factores y proteasas que le permiten atravesar el epitelio intestinal y alcanzar la cavidad abdominal. Además, mediante las moléculas de ES, logra la evasión del sistema inmune (3), gracias a que logra promover una inmunomodulación de su hospedero hacia el fenotipo Th2 (4). De esta manera, logra la infección crónica en la vesícula y en los canalículos hepato biliares, y a medida que el tremátodo alcanza su estado adulto nutriéndose de su hospedero, promueve el daño tisular (5), lo que provoca un influjo de macrófagos, eosinófilos y linfocitos (6), derivando en fibrosis hepática y mecanismos de reparación (7). Los tremátodos adultos alcanzan los canalículos biliares (8), donde además de nutrirse de la hemoglobina del hospedero (9), comienzan a poner huevos (10), que serán excretados por el hospedero, dando lugar a la continuidad del ciclo de vida del parásito. Adaptado de Lalor et. al. 2021¹⁹⁵

Para impedir la continuidad del ciclo de vida del parásito sería necesario no solo el control en las personas, sino también el control de los moluscos que sirven de hospederos intermedios²⁰³ y tratamiento del ganado. La aplicación de molusquicidas permite controlar las poblaciones de hospederos intermediarios con una buena relación costo-beneficio a corto plazo. No obstante, esta estrategia trae aparejado el riesgo de contaminación ambiental de otras especies que comparten el hábitat con los moluscos y que son económica o biológicamente relevantes, tales como cangrejos o peces. Además, el riesgo ecológico de disminuir drásticamente a una especie de la cadena trófica puede traer consecuencias inimaginadas, por lo que en general se busca evitar este tipo de estrategias^{188,204}.

Dado el complejo ciclo de vida de *F. hepatica*, con estadios parásitos y de vida libre, el hospedero intermediario que utiliza y la capacidad de infectar múltiples hospederos definitivos, es altamente improbable que la fasciolosis pueda ser controlada mediante una sola estrategia. La forma más efectiva sería mediante un enfoque integral considerando el concepto de “Una Salud”, con un abordaje interdisciplinario desde múltiples enfoques y sectores^{203,205}.

En la actualidad la estrategia más utilizada para el control de esta enfermedad es el uso de drogas antihelmínticas, como el triclabendazol, albendazol, nitroxinil, oxiclozanide, closantel, entre otros, tanto en humanos como en ganado²⁰⁶. Sin embargo, el tratamiento es costoso y ya se ha evidenciado la ocurrencia de reinfecciones y resistencia^{207,208}. En particular, se ha comprobado la emergencia de resistencia al triclabendazol en el ganado en 17 países con fasciolosis endémica. Esto se debe a tratamiento con dosis sub óptimas o inconsistencias en el tratamiento de animales infectados en la práctica agropecuaria. Sin embargo, también se ha evidenciado resistencia a triclabendazol en el tratamiento de fasciolosis humana, quizás debido a que los tremátodos resistentes que infectan al ganado también pueden infectar a los humanos²⁰⁹. Por esta razón es necesario desarrollar estrategias de control alternativas, o idealmente estrategias de prevención de ocurrencia de esta enfermedad, que sean más efectivas y de menor costo.

A pesar de los esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigación para lograr desarrollar una vacuna contra este parásito, aún no hay vacunas disponibles contra *F. hepática*. Se han estudiado varias plataformas, para las que se han estudiado distintos antígenos proteicos como posibles candidatos vacunales, entre los que se destacan catepsina B, catepsina L, glutatión S-transferasa, y leucinaminopeptidasas tanto para ser utilizados en vacunas de subunidades proteicas²¹⁰, como en vacunas a ADN^{211–213}.

En particular, se ha aislado una leucinaminopeptidasa presente en los productos de ES de *F. hepática* en estado adulto (*FhLAP*), que ha demostrado poseer actividad de hidrolizar distintos aminoácidos aminometilcumarin, particularmente el leucin-7-amino-4-metilcumarin (Leu-NHMc)²¹⁴. *FhLAP* tiene un peso molecular de 56.401 Da, es una enzima homohexamérica²¹⁵, perteneciente a la familia de M17 en la base de datos de peptidasas MEROPS, y como tal, se une a dos cationes²¹⁶. Esta proteína purificada a partir de un extracto de ES de *F. hepática* demostró conferir buen nivel de protección en ovinos²¹⁷. Al ser producida de forma recombinante confirió protección frente al desafío con *F. hepática* en conejos²¹⁸ y al ser utilizada como antígeno en formulaciones con distintos adyuvantes, tales como Alhydrogel® (Sigma), dietielaminoetil-dextrano (DEAE-D, Pharmacia, Uppsala, Sweden), Ribi (Sistema de adyuvantes conteniendo MPL, TDM y CWS, Sigma), Adyuvac 50 (un adyuvante oleoso producido por Laboratorios Santa Elena, Uruguay) confirió protección en ovinos²¹⁵. Aunque los rumiantes son el modelo ideal para estudiar la vacunación frente a este tremátodo, el modelo murino también ha sido ampliamente utilizado, debido a que, en comparación al trabajo con grandes animales que suponen un alto costo y dificultades logísticas adicionales, el trabajo con ratones es más accesible, y además estos animales son sensibles a la infección por *F. hepática*. Por otro lado, existe mayor disponibilidad de reactivos para caracterizar la respuesta en modelo murino que en otros modelos, lo que lo hace también más ventajoso. Es importante destacar que *F. hepática* adapta su tamaño al tamaño del hospedero, debido a varios factores, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, ya que por ejemplo, el tamaño de los tremátodos adultos encontrados en hígados bovinos en ocasiones supera al tamaño del hígado de un ratón. En este sentido, se han evaluado distintos candidatos vacunales contra *F. hepática* en modelo murino, lo que supone antecedentes para escalar la vacuna experimental a animales de producción.

Hasta ahora se han obtenido niveles de protección que oscilan entre 46,9 y más de 80 % en distintos modelos animales, lo que indica que lograr una vacuna contra *F. hepática* podría ser

una meta alcanzable. Sin embargo, aún no hay candidatos vacunales en fases clínicas (ni para humanos ni para animales). Esto quizás puede deberse a diferencias en las características estructurales de los antígenos candidatos, la factibilidad de lograr producir los antígenos a gran escala y en condiciones de buenas prácticas de manufactura o laboratorio (GMP o GLP respectivamente) debido a desafíos biotecnológicos, pero también por falta de recursos financieros, el estudio mediante protocolos diferentes (distintas dosis, vías y esquemas de vacunación), la falta de correlatos de protección para esta enfermedad, y además, debido a que quizás aún no se ha seleccionado el adyuvante adecuado^{219,220}.

A pesar de que no existen correlatos de protección asociados a fasciolosis, estudios previos han permitido determinar que la infección por *F. hepatica* promueve la activación de la respuesta inmune del hospedero con un perfil Th2 dentro de los primeros 7 días de la infección, con la generación de altos niveles de anticuerpos de la subclase IgG1, sin la presencia de IgG2²²¹⁻²²⁵, y una *down*-regulación de la respuesta del fenotipo Th1 tanto en modelo murino^{226,227} como bovino^{228,229}. En este sentido, los estudios en modelo murino han permitido entender que frente al daño hepático causado por el tremátodo, el hospedero limita la respuesta pro-inflamatoria Th1, y promueve mecanismos anti-inflamatorios y reparadores o cicatrizantes mediante una respuesta de tipo Th2, la inducción de macrófagos de fenotipo M2^{224,225} y el reclutamiento de mastocitos²³⁰. Esto además, evita el desarrollo de una respuesta contra el parásito, logrando que éste establezca una infección crónica. Al igual que sucede en otras infecciones parasitarias²³¹, es probable que la respuesta de tipo Th2 o reguladora, también proteja al hospedero de daño hepático excesivo mediado por efectores inmunológicos¹⁴⁸. La respuesta reguladora o antiinflamatoria puede ser efectiva para prevenir la muerte del hospedero en infecciones con baja carga parasitaria, pero en el caso de infecciones con alta carga parasitaria, la migración al hígado de los tremátodos puede causar un daño tal, que sobrepase el beneficio de la respuesta reparadora, y cause falla o disfunción hepática²¹⁰. Por esta razón, una de las estrategias que se podría utilizar para el desarrollo de una vacuna contra este tremátodo es el uso de adyuvantes que promuevan la generación de una respuesta inmune polarizada hacia el fenotipo Th1, como las saponinas de *Q. brasiliensis*.

1.5.2. Influenza

El virus de influenza es el agente etiológico de la gripe en numerosas especies animales, tanto aves y mamíferos, entre los que se incluyen (y no se limitan a) murciélagos, cetáceos, animales de producción, mascotas y humanos. Estos virus pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y hay 4 tipos de virus de influenza (género *influenzavirus* A-D). Todos los virus de Influenza tienen un genoma de ARN de simple hebra en sentido negativo segmentado²³². Los tipos A y B contienen 8 segmentos de ARN, que codifican para subunidades de la ARN polimerasa, la nucleoproteína viral (NP), la proteína de matriz (M1), la proteína de membrana (M2), la proteína no-estructural (NS1), la proteína de exportación nuclear (NEP), y las glicoproteínas virales, como la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). HA es la proteína que interaccionará con los residuos de ácido siálico de la célula hospedera, permitiendo el ingreso de las partículas virales a ésta; mientras que la NA facilita la liberación de los viriones una vez que se ensamblaron dentro de la célula hospedera. Estas dos glicoproteínas se encuentran en la superficie de las partículas virales, y son los principales blancos de los anticuerpos que se generan frente a la infección o a la vacunación con Influenza. Sin embargo, ambas proteínas son los antígenos que presentan

mayor variabilidad, y por esta razón los virus de influenza tipo A se clasifican en subtipos antigénicos según su HA (H1-H18) y NA (N1-N11), y los subtipos se denominan combinando el subtipo de HA y NA (por ejemplo: H1N1, H3N2, etc). En el caso de HA, se ha reportado que solo los subtipos H1, H2, H3, H5 y H7 pueden infectar a los humanos, aunque estos dos últimos no se transmiten entre humanos²³³.

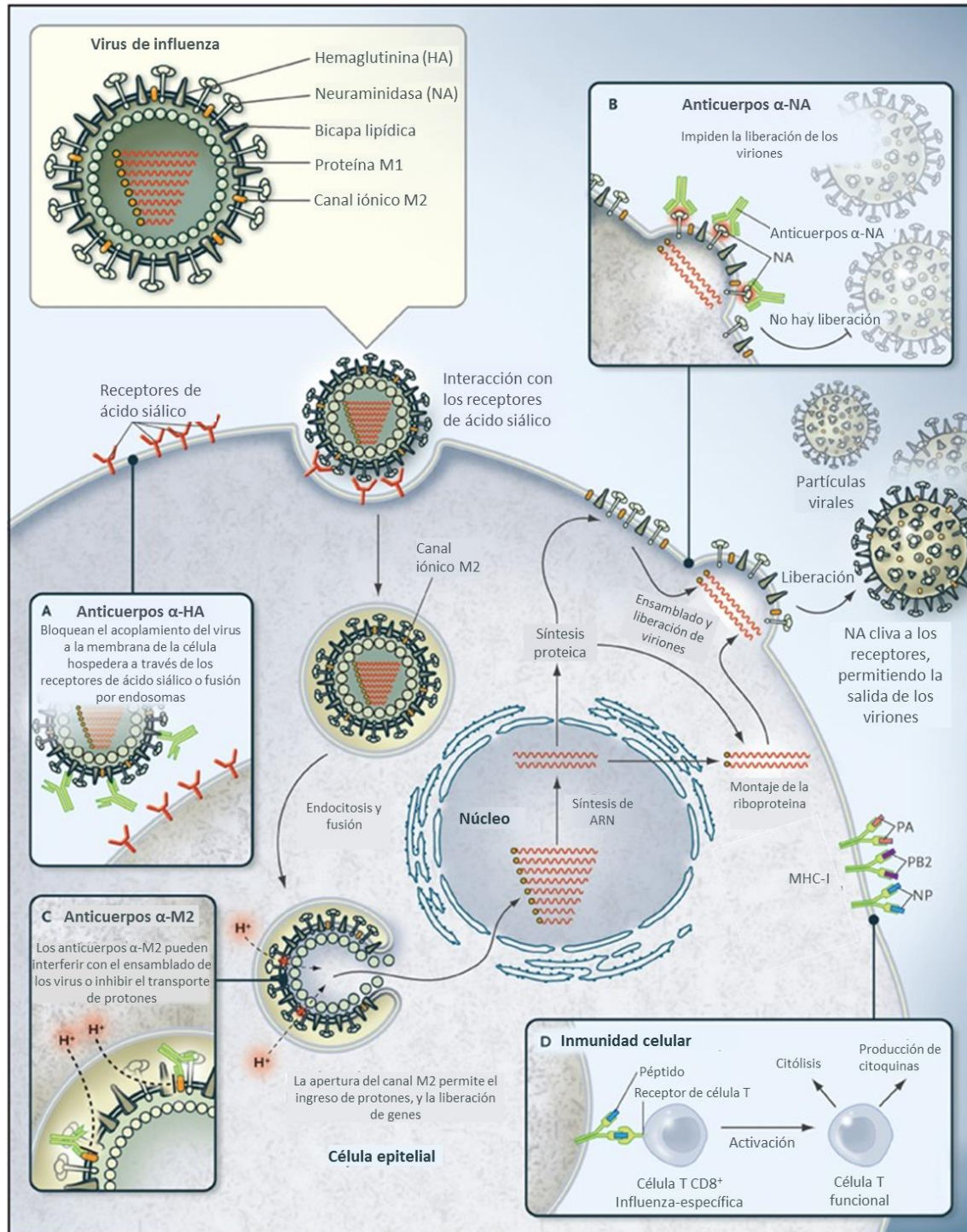


Figura 13. Influenza: esquema del virus y de la infección a una célula epitelial. Se muestra un esquema del virus de Influenza tipo A (cuadrante superior izquierdo). El virus es internalizado por la célula hospedera mediante la interacción de los residuos de ácido siálico de ésta con la HA viral. Una vez internalizado, el virus utiliza la maquinaria replicativa celular para la producción de nuevos viriones. Se muestran los efectores de la inmunidad del hospedero, tales como anticuerpos contra la HA (a) que tienen capacidad neutralizante ya que impiden el ingreso del virus a la

célula. Además, se generan anticuerpos anti-NA, que bloquean la liberación de nuevos viriones al exterior celular (b), así como también anticuerpos anti-M2 que impiden el ensamblado de los viriones (c), y la inmunidad celular, cuya función es eliminar a la célula infectada (d). Adaptado de Lambert & Fauci 2010²³⁴.

Cada aislamiento de influenza se denomina de acuerdo a su tipo o género, hospedero, lugar, número y año de aislamiento. Los virus de Influenza tipo C y D tienen un genoma con solo 7 segmentos de ARN, y la infección que causan en humanos es prácticamente asintomática, aunque se han encontrado casos de infección por Influenza tipo C particularmente en niños²³⁵. A pesar de la disponibilidad de vacunas contra este virus, la OMS estima que las infecciones causadas por Influenza tipo A y B son responsables de 3 a 5 millones de casos de gripe severa y 290.000 – 650.000 casos de muerte por año a nivel mundial^{236,237}. Los síntomas de infección por Influenza varían desde una infección leve de las vías respiratorias altas, caracterizada por resfriado, fiebre, dolor de garganta, mucosidad, tos, dolor de cabeza, dolor de las articulaciones, fatiga y fiebre, hasta casos de neumonía severa o incluso letal, debido a infección por Influenza de las vías respiratorias bajas, o a bacterias oportunistas que logran infectar estas vías en conjunto con Influenza. La infección con este virus también puede derivar en un amplio rango de complicaciones no respiratorias, tales como afecciones cardíacas, del sistema nervioso central y otros órganos^{238,239}. La naturaleza segmentada del genoma viral permite rearrreglos o “saltos antigénicos” (del inglés “*antigenic shift*”), es decir, el intercambio de dos segmentos del genoma cuando dos virus del mismo tipo invaden la misma célula. Una característica inherente a Influenza tipo A es que además de infectar a los humanos, circula en diversas especies (animales domésticos, cerdos, caballos, aves de corral, aves migratorias, etc). Este amplio reservorio funciona como fuente inagotable de diversos genes de HA y NA que se pueden intercambiar por rearrreglos al co-infectar al mismo hospedero, incrementando radicalmente la diversidad viral, y derivando en la generación de cepas capaces de causar pandemias en los humanos, tal como ha ocurrido 4 veces en los últimos 100 años: en 1918 (durante la llamada “gripe española”, que comenzó en Estados Unidos y dejó un saldo de más de 40 millones de muertes, cepa H1N1), en 1957 (cepa H2N2), en 1968 (cepa H3N2) y en 2009 con la llamada “gripe porcina” y la generación de la cepa pandémica H1N1²⁴⁰. Estos eventos ocurren esporádicamente, en general con una frecuencia de entre 10 y 50 años, aunque no es posible predecir con exactitud cuándo será la próxima. Debido a la capacidad de los virus de infectar hospederos de un amplio rango de especies, tampoco es posible prevenir estos eventos²⁴¹. Además, debido a las características del genoma, ocurren eventos de deriva antigénica (en inglés “*antigenic drift*”) que tienen como resultado mutaciones puntuales en las proteínas, principalmente en la hemaglutinina (HA) y en la neuraminidasa (NA) por lo que se generan nuevas cepas en cada estación invernal que escapan a la inmunidad preexistente y ocasionan brotes de influenza estacional²⁴². Las vacunas son la herramienta más costo-efectiva para prevenir la gripe causada por Influenza en humanos y animales^{232,243,244}. En humanos, las vacunas contra influenza se han utilizado desde 1940, logrando disminuir significativamente la incidencia de esta enfermedad y evitando innumerables muertes²⁴⁵. Las vacunas contra influenza disponibles actualmente son de subunidades, inactivadas o vivas atenuadas. Las más utilizadas consisten en vacunas de subunidades conteniendo antígenos de superficie tales como HA o NA parcialmente purificados, o las vacunas fragmentadas e inactivadas, que se obtienen mediante la inactivación y la disrupción por métodos químicos de los cultivos virales²⁴⁶. Las vacunas vivas atenuadas contra influenza contienen cepas adaptadas a la replicación a bajas temperaturas, por lo que su replicación es deficiente a temperatura corporal. Estas vacunas se administran por vía intranasal (i/n), y aunque desencadenan potentes respuestas humorales y celulares, su uso se ha restringido a individuos sanos entre 2 y 49 años de edad, y están contraindicadas en mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas por razones de seguridad²⁴⁶.

Independientemente del tipo de vacuna, debido a los fenómenos de deriva antigénica, las cepas utilizadas como antígeno vacunal se deben actualizar año a año, considerando las cepas circulantes. Además, las vacunas contra influenza son tri o tetravalentes, y contienen la última cepa pandémica (generada debido al salto antigénico), y dos o tres (respectivamente) cepas estacionales circulantes. Muchos grupos de investigación en todo el mundo están trabajando en la generación de una vacuna de influenza “universal” que no deba actualizarse anualmente. Lamentablemente, a pesar de los esfuerzos realizados, aún no se ha logrado desarrollarla, y constituye una necesidad médica no atendida muy importante^{244,245}. Se ha demostrado que para lograr la protección frente a Influenza se necesita una respuesta celular de linfocitos Th1 que promuevan el cambio de clase de los anticuerpos y activen a los CTL. Éstos son muy importantes para lograr la eliminación del virus, y se ha demostrado que en su ausencia, la respuesta de anticuerpos y los mecanismos mediados por ésta también logran la eliminación viral, pero de forma más lenta²⁴⁷. Una de las principales limitantes de las vacunas vivas atenuadas de influenza, es que logran la activación de linfocitos T CD8⁺, pero fallan en la generación de una potente respuesta de CTL de memoria²⁴⁸. La respuesta humoral es fundamental para lograr la protección frente a Influenza^{249,250}. En general, las células B reconocen principalmente a los antígenos de superficie NA y HA²⁵¹. En particular, se considera que los anticuerpos que reconocen el dominio globular de HA tienen capacidad neutralizante, ya que es a través de la interacción de este dominio con los residuos de ácido siálico de las células de los hospederos que este virus logra la internalización a la célula. Por lo tanto, los anticuerpos que sean capaces de reconocer este dominio y de impedir estéricamente esta interacción no tendrán actividad neutralizante. Esto puede observarse al estudiar la capacidad de los anticuerpos generados por la vacunación de impedir la capacidad hemaglutinante del virus *in vitro*, mediante la realización de un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Es importante mencionar que, aunque este título se correlaciona de manera *imperfecta* con la protección, un título de HAI mayor a 1:40 (determinado mediante protocolos estandarizados) ha sido aceptado por numerosas agencias regulatorias, incluyendo la FDA, como un *surrelato* de la eficacia vacunal^{241,249}. Aunque en humanos las respuestas de anticuerpos anti-Influenza son potentes y duraderas²⁵²⁻²⁵⁴, están dirigidas principalmente contra la HA, y dado que este antígeno presenta alta tasa de mutagenicidad debido al fenómeno de deriva antigénica^{255,256}, esos potentes anticuerpos duraderos fallan en conferir protección frente a las nuevas cepas de influenza circulantes. En humanos las mucosas de las vías respiratorias constituyen la principal vía de ingreso de este virus al organismo, por lo que los anticuerpos del tipo IgA secretoria (sIgA) juegan un papel fundamental en la protección frente a la infección por Influenza. Se ha demostrado que son estos anticuerpos, y no la respuesta humoral sistémica, los que tienen la capacidad de impedir la transmisión viral^{257,258}. Con el fin de promover respuestas inmunes protectoras y mejorar la efectividad de las vacunas, incluyendo en poblaciones específicas, tales como los adultos mayores en los que las vacunas inactivadas no logran conferir protección, se han desarrollado vacunas contra influenza con adyuvantes^{233,259}, tales como sales de aluminio, MF59®, AS03 y AF03^{233,260}. Aunque las sales de aluminio se han utilizado ampliamente, en el caso de las vacunas contra cepas pandémicas de Influenza, tales como H1N1 o H5N1, mostraron una baja eficacia, debido principalmente a que este tipo de adyuvantes no logra desencadenar una respuesta de CTL^{261,262}. Mejorar las vacunas contra influenza A es una necesidad de salud pública, ya que se ha demostrado que ciertos grupos, tales como adultos mayores o personas inmunodeprimidas, no responden adecuadamente a las vacunas convencionales contra la gripe estacional y son por lo tanto, susceptibles a infecciones graves por Influenza que requieren internación en cuidados intensivos, e incluso derivan en la muerte. Para poder mejorar las vacunas contra este patógeno existen varias estrategias, tales como el desarrollo de una vacuna universal contra influenza, el

uso de nuevas tecnologías (tales como vacunas a ARNm) o el agregado de adyuvantes que potencien, prolonguen y modulen la respuesta para conferir una mejor protección²⁴⁴. El uso de SBAs en vacunas contra influenza se ha evaluado a nivel preclínico²³³, a nivel veterinario existe una vacuna contra la influenza equina que contiene ISCOMs de *Q. saponaria* como adyuvante (Equip F®, Zoetis)²⁶³, y a nivel clínico una vacuna conteniendo el adyuvante Matrix-M se encuentra en fase II^{245,264}. Considerando estos promisorios antecedentes, las características de los SBAs de *Q. brasiliensis*, tanto de forma soluble como en NPs tipo ISCOMs o IMX, y la necesidad de mejorar las vacunas contra influenza, en este trabajo se utilizó el modelo de influenza para evaluar la respuesta inmune antígeno-específica inducida por la vacunación de formulaciones experimentales utilizando como antígeno vacunas comerciales trivalentes fragmentadas e inactivadas de Influenza (TSIV) junto a los SBAs de *Q. brasiliensis*. Además, dado el potencial pandémico del virus de influenza, se evaluó la capacidad de estos adyuvantes en generar efecto *dose-sparing*. Lamentablemente, durante la pandemia de Covid-19, y a pesar del excelente desarrollo de las vacunas contra SARS-CoV-2, pudimos ser testigos de primera mano de la inequidad en el acceso a las vacunas frente a la demanda mundial éstas. Por esta razón, encontrar alternativas que permitan generar más cantidad de dosis de vacunas con una determinada cantidad de antígeno disponible, es una estrategia óptima para la rápida producción masiva de vacunas, permitiendo ampliar el acceso a las vacunas por parte de la población.

Todo lo anteriormente expuesto evidencia la clara necesidad de contar con nuevos compuestos que puedan ser utilizados como adyuvantes de vacunas, que promuevan que éstas generen una respuesta con un fenotipo Th1 y respuestas celulares con funciones citotóxicas, de manera de prevenir infecciones por patógenos intracelulares u otros patógenos para los que se requiera este tipo de respuesta para evitar su infección o la enfermedad que causan. Las saponinas de *Q. saponaria*, en particular QS-21, han demostrado ser potentes adyuvantes capaces de promover respuestas inmunes con este fenotipo. Sin embargo, las dificultades para su obtención y la escasez de las mismas hacen que se deban buscar alternativas. Las fracciones de saponinas obtenidas de extractos foliares de *Q. brasiliensis* han demostrado que podrían ser una buena estrategia en este sentido, ya que se ha evidenciado que promueven potentes respuestas humorales y celulares contra distintos antígenos virales en modelo murino, de manera segura. Sin embargo, aún se debe elucidar su estructura y se deben conocer sus mecanismos de acción, con el objetivo de evitar posibles efectos adversos en diferentes circunstancias en que se apliquen, ya sea por la combinación con el antígeno u otros componentes de la formulación vacunal, o por las características de los individuos a ser inmunizados. En este marco, el desarrollo de esta tesis tiene como cometido estudiar la interacción de estas fracciones de saponinas con los mecanismos efectores de la inmunidad innata, a la vez que ahondar en la inmunidad adaptativa desencadenada frente a un antígeno parasitario y a uno viral. Además, nos planteamos estudiar si la inmunidad evidenciada es capaz de conferir protección frente a la infección por los distintos patógenos en modelo murino.

2. Objetivos

Objetivo general:

Estudiar la respuesta inmune desencadenada por adyuvantes basados en saponinas obtenidas de extractos foliares de *Q. brasiliensis*, en forma soluble o en nanopartículas tipo ISCOMs o IMX.

Objetivos específicos:

- Obtener fracciones de saponinas a partir de extractos foliares de *Q. brasiliensis*, y con ellas formular nanopartículas tipo ISCOMs o IMX.
- Estudiar cómo estos adyuvantes, tanto de forma soluble como nanoparticulada, estimulan al sistema inmune innato.
- Estudiar la respuesta inmune adaptativa que desencadenan estos adyuvantes, utilizando dos modelos: un antígeno parasitario, de *Fasciola hepática*, y uno viral, de Influenza. Ambos modelos son de importancia para la salud animal y humana respectivamente. Estudiar la protección conferida por las formulaciones vacunales conteniendo estos adyuvantes frente al desafío en ambos modelos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* y extracto acuoso de propóleos

3.1.1. Obtención de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*

Las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* se obtuvieron a partir de extractos foliares de esta especie²⁶⁵. La Fracción B fue obtenida y cedida gentilmente por el Dr. Fernando Ferreira del Espacio de Ciencia y Tecnología Química del Centro Universitario de Tacuarembó, Universidad de la República, Tacuarembó, Uruguay¹²². Las fracciones QB90, QB80 y el extracto acuoso (AE) fueron obtenidas y cedidas por los Dres. Arthur Fett-Neto y Anna C. Yendo y del Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Biotecnología y Departamento de Botánica, Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil²⁶⁶.

Además, en nuestro laboratorio realizamos la extracción y obtuvimos fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* siguiendo el mismo protocolo que nuestros colaboradores de Brasil²⁶⁶. Brevemente, se colectaron hojas de *Q. brasiliensis* en el parque Batlle, Montevideo (34°53'44"S 56°09'00"O) en abril 2018, se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 40 °C durante 7 días, y se molieron con un *mixer*. Luego, se colocaron 100 g de hojas molidas en 800 mL de agua milliQ (mQ) y se mantuvieron en agitación a 4 °C toda la noche (ON, del inglés *overnight*). El extracto se filtró con papel de filtro Whatman con bomba de vacío, y al filtrado se agregaron 100 mL de gelatina 2 % (p/v) en agua mQ tibia, para precipitar taninos y otras impurezas. Cuando se observó que la solución se tornó opaca, se filtró nuevamente por papel de filtro con bomba de vacío. Para eliminar impurezas orgánicas, se agregó 200 mL de acetato de etilo (calidad técnica, Droguería Industrial Uruguaya), se mezcló vigorosamente en decantador, y se dejó decantar hasta que se separaron las fases. Luego de repetir este paso se descartó la fase orgánica, se colectó la fase acuosa, y se liofilizó (Alpha I-6, Christ, Bomba de vacío E2M5, Edwards High Vacuum Int, Sussex, England). El producto liofilizado constituye el AE, a partir del cual se obtendrán las fracciones de saponinas.

Las fracciones de saponinas se obtuvieron mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-LC). Para ello, se empaquetó una columna de 100 g de Lichoprep® C-18 RP-18 (40-63 µm, código 1.13900.0250, nº CAS 108688-10-4, Merck) con 1,5 volúmenes de alcohol etílico 96 % (preparado con agua mQ a partir de alcohol etílico 99,5 %, calidad cromatografía líquida & HPLC, código U010-14-03, Dorwill). Una vez que la fase estacionaria se asentó y se eliminaron las burbujas y se realizó el enjuague correspondiente con el solvente (agua destilada), se disolvió 1 g de AE en el menor volumen de agua destilada posible, y se cargó en la columna. El AE se eluyó con 100 mL de un gradiente de metanol (para análisis, calidad USP, código 414816, Carlo Erba), comenzando con agua destilada y finalizando con 100 % metanol, incrementando el gradiente de metanol 10 % cada vez. Las fracciones de saponinas QB80 y QB90 se colectaron con el eluyente correspondiente a 80 % y 90 % de metanol respectivamente. Se eliminó el solvente mediante rotaevaporación (Rotavapor® R-300, BUCHI) a 39 °C, y las fracciones obtenidas se guardaron en un recipiente limpio y seco, en campana cerrada al vacío con sílica gel a temperatura ambiente hasta su uso.

3.1.2. Obtención de extractos etanólicos de propóleos

Se obtuvieron propóleos uruguayos extraídos colmenas a fines de primavera y principios de verano de 2017/2018 mediante el método de raspado por parte de Ing. Agr. Elena Patron, productora apícola del departamento de Soriano. Los propóleos se almacenaron en oscuridad y a -20°C hasta su uso. Con ellos se prepararon extractos de alcohol etílico de propóleos (EEP) de acuerdo a lo descrito previamente¹⁸¹. Brevemente, 2 g de propóleos obtenidos por raspado y molidos se disolvieron en 20 mL de etanol 75 % o etanol absoluto (Para Análisis ACS, código DO10-03-03, Dorwill Química Analítica). Las soluciones se calentaron a 50-60 °C en baño térmico. Luego de enfriadas, se filtraron por filtro de papel, luego por papel Whatman, y luego por filtro esterilizante Minisart RC hydrophilic (de celulosa regenerada 0,22 µm). Los extractos etanólicos de propóleos (EEP) se mantuvieron a -20 °C y en oscuridad hasta su uso.

3.2. **Adyuvante comercial utilizado**

A lo largo de los ensayos, se utilizó la mezcla de saponinas comercial QuilA® (Brenntag Biosector, Denmark) como control de saponinas ya utilizadas comercialmente como adyuvante.

3.3. **Antígenos**

3.3.1. Antígeno modelo (OVA)

Para la puesta a punto de las formulaciones tipo ISCOMs con las distintas fracciones de saponinas se utilizó como antígeno modelo la proteína albúmina obtenida de la clara de huevo de gallina (OVA, código A-5253, SIGMA). Ésta es una glicoproteína fosforilada, y su porción peptídica consiste de 385 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 42,7 kDa. Debido a su alta glicosilación con residuos de manosa, es un ligando del receptor de manosa.

3.3.2. Antígeno reportero (DQ-OVA)

El antígeno DQTM-OVA (código D12053, Molecular Probes, Life Technologies) consiste en la proteína OVA (naturalmente glicosilada) conjugada al fluoróforo BIODIPY®. Cuando la proteína está fuertemente marcada por esta sonda, la fluorescencia sufrirá efecto de *quenching*. Sin embargo, luego de la hidrólisis proteolítica, los productos de OVA marcados con una única molécula del fluoróforo emitirán fluorescencia en el canal de FITC. Si además estos fragmentos se acumulan formando excímeros, emitirán fluorescencia en el canal de PE. Este antígeno fue utilizado en estudios de internalización y procesamiento antigénico, como se explicará más adelante.

3.3.3. Antígeno recombinante parasitario (*Fasciola hepatica*)

Se utilizó una leucinaminopeptidasa de *Fasciola hepatica* (FhLAP)²¹⁴, producida en forma recombinante y cedida gentilmente por la Dra. Gabriela Maggioli y colaboradores de la Unidad de Biología Parasitaria, Facultad de Ciencias, UdelaR. Previamente se demostró que esta enzima recombinante es idéntica a la enzima nativa purificada de tremátodos de *F. hepatica* adultos. FhLAP está codificada por 1569 pares de bases (número de acceso en GeneBank: AY64459), que codifican para 523 aminoácidos, con una masa molecular de 56.401 Da, y un punto isoelectrico

(pl) de 7,26. La predicción de su estructura indica que carece de señales de tráfico intracelular o transmembrana, sugiriendo que tiene una localización citoplasmática²¹⁸.

Pertenece a la familia M17 de las leucinaminopeptidasas, y muestra una marcada preferencia amidolítica contra el sustrato sintético de amino-peptidasa I-leucin-7-amino-4-metilcumarin (Leu-AMC) y también fue activa contra Cys-AMC y Met-AMC. Además, es estimulada por la adición de iones divalentes, preferentemente Mn^{2+} , e inhibida por bestatina y cisteína²¹⁸.

Esta enzima juega un rol fundamental catabolizando péptidos generados por la actividad de múltiples endopeptidasas asociadas de la cavidad intestinal sobre polipéptidos del hospedero (principalmente generados por la digestión de hemoglobina) y, por lo tanto, liberando aminoácidos a ser utilizados en el anabolismo proteico del tremátodo²¹⁶, siendo crucial para la adecuada nutrición y supervivencia de *F. hepatica* en el estadio adulto.

FhLAP y otros ortólogos de gusanos planos constituyen un *cluster* bien definido y distante de enzimas de vertebrados. Esta proteína ha demostrado ser una buena candidata antigénica para prevenir la infección por este parásito, tanto cuando fue usada como antígeno en su forma nativa y recombinante en ovejas^{215,217,218}, como en su forma recombinante en conejos²¹⁸.

3.3.4. Antígeno viral (influenza)

Se purificó antígeno de influenza (Flu) a partir de dos vacunas comerciales contra influenza, trivalentes, inactivadas, fragmentadas (TSIV) y sin adyuvantes. Se utilizó la vacuna contra la gripe estacional cepas 2016 para el hemisferio sur (A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)), producida por Instituto Butantan, Brasil, gentilmente cedida por el Dr. Samuel Cibulski. Además, se utilizó la vacuna Vaxigrip® cepas 2018 (A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 – cepa análoga, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) – cepa análoga, B/Phuket/3073/2013 – cepa análoga) producida en huevo por Sanofi Pasteur, y gentilmente cedida por la Dra. Natalia Goñi, Laboratorio Calmette, Ministerio de Salud Pública (MSP).

Cada una de estas vacunas contiene 30 $\mu\text{g/mL}$ de hemaglutinina (HA) por cada cepa del virus Influenza. Dado que no contienen adyuvantes, fueron concentradas utilizando un Amicon® Ultra-15 30 kDa (Millipore, Ref: UFC903008). La concentración de antígeno se calculó considerando el volumen inicial y final obtenido, con una pérdida del 10 % según indicaciones del fabricante. La concentración final de 1 mg/mL de HA/cepa de influenza se logró agregando el volumen adecuado de solución salina.

Para evitar la citotoxicidad en los ensayos *in vitro*, el antígeno obtenido de Vaxigrip fue dializado y resuspendido en buffer PBS.

3.4. **Formulación de adyuvantes nanoparticulados**

Las nanoformulaciones tipo ISCOM evaluadas en este trabajo se prepararon por dos métodos distintos: el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹ y el método de diálisis²⁶⁷.

3.4.1. Formulación de ISCOMs e ISCOMATRIX por inyección rápida de etanol

Para la formulación mediante el método de inyección rápida de etanol se siguió el protocolo descrito por Lendemans y colaboradores¹⁷⁹ en condiciones de esterilidad. Brevemente, se

preparó una solución alcohólica conteniendo 37,5 mg de fosfatidilcolina (PC, Avanti Polar Lipids) y 11,2 mg de colesterol (CHOL, Avanti Polar Lipids) en 2 mL de alcohol etílico absoluto (Para Análisis ACS, código DO10-03-03, Dorwill Química Analítica). Por otra parte, se disolvió 1 mg de la fracción de saponinas en una solución de 1 mL de antígeno en buffer PBS y luego se agregan 480 μ L de PBS. Para preparar nanopartículas tipo ISCOMATRIX, es decir, ISCOMs sin antígeno, simplemente se omitió el antígeno. A esta solución se le agregaron 120 μ L de la solución alcohólica, mediante inyección rápida. Se filtró por 0,22 μ m (Minisart código 16534-K, Sartorius Stedim Biotech) bajo flujo laminar, y se colocó en agitación a 4 °C y baja velocidad durante 4 días. Se retiró de agitación, y a 480 μ L de formulación se le agregaron 2,52 mL de PBS. Se guardó a 4°C.

3.4.2. Formulación de ISCOMs e ISCOMATRIX por el método de diálisis

La formulación de nanopartículas tipo ISCOMATRIX mediante el método de diálisis se realizó según lo descrito por Mowat & Reid²⁶⁸ con modificaciones. Brevemente, se preparó una solución “lipid mix”, mezclando dos soluciones 100 mg/mL en cloroformo (Para Análisis, código DO26-04-24, Dorwill Química Analítica) de CHOL (Avanti Polar Lipids) y PC (Avanti Polar Lipids) en relación 1:1. Luego, 0,5 mL de esta solución se agregaron a 2,5 mL de una solución de detergente no iónico N-decanoyl-N-methylglucamina MEGA 10 (código 850542P Avanti, Sigma) al 20 % en agua mQ. Se agitó a 45 °C hasta que la solución se clarificó. Se agregaron 0,5 mL de esta solución clarificada a 15 mg de las distintas fracciones de saponinas, y luego se agregó agua mQ c.s.p. 5 mL. Las formulaciones se colocaron en membranas de diálisis de celulosa (código D9777 – 100 FT, Sigma), y se dializaron contra 10 L de buffer TRIS-Cl 50mM pH=8,5 y 0,001% de timerosal (código T-5125, Sigma), cambiando el buffer cada 12 horas durante 4 días. Luego, se dializó durante 20 horas más contra buffer PBS pH = 6,5 – 7,0 a 4 °C. Las formulaciones se filtraron por 0,22 μ m (Minisart código 16534-K, Sartorius Stedim Biotech) bajo flujo laminar, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Recientemente hemos publicado este protocolo en un capítulo del libro “Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Protocols”²⁶⁷, ver Anexo 7.2.

3.4.3. Diseño y formulación de ISCOMPros e IMXPros

La formulación de nanopartículas tipo ISCOMs o matrices-ISCOMs (IMX) con las fracciones QB80 o QB90 y los EEP se realizó mediante el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹ descrito previamente, con la variante que se utilizó la solución de EEP (preparados según 3.1.3) en lugar del alcohol etílico. A estas nanoformulaciones las denominamos IMXPro cuando no contenían antígeno incorporado, o ISCOMPro, cuando al momento de la formulación se les incorporaba antígeno proteico, ya sea OVA, FhLAP o Flu.

3.5. Caracterización de formulaciones

3.5.1. Caracterización de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* por MALDI-TOF

La caracterización de las fracciones de saponinas por espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF (del inglés, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) fue gentilmente realizada por la Dra. Norma Suárez de nuestro Departamento, de acuerdo a protocolos establecidos y reportados previamente por nosotros¹³⁰. Brevemente, las muestras se analizaron un

espectrómetro de masas Microflex LR MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) con un láser de nitrógeno de 337 nm operando en el modo lineal positivo con extracción retardada y optimizado en el rango m/z de 0-20 kDa. Las calibraciones se realizaron con un mix de péptidos estándar para calibraciones (Bruker Daltonics). Se preparó una mezcla de 1:1 (v/v) de una solución de 1 mg/mL de cada muestra a analizar y de la solución matriz (10 mg/mL de ácido 2,5-dihidrobenczoico en H₂O estéril y 1% de ácido trifluoroacético, TFA). Las mezclas muestra/matriz se colocaron en una placa de 96 wells de acero inoxidable y se las dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente. El láser fue disparado 100 veces en 10 locaciones de cada muestra en la placa de 96 wells, con un acumulado de 1000 veces por muestra a 30 % de intensidad. Además de analizar las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*, se analizó la fracción comercial QuilA®, y se compararon los patrones espectrales obtenidos.

3.5.2. Caracterización de extractos de propóleos

3.5.2.1. *Determinación relativa del contenido de polifenoles totales en EEP*

El contenido relativo de polifenoles totales en los EEP se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC, código G9252, Sigma)^{269–271}. Brevemente, se mezclaron diluciones de EEP o de ácido gálico (estándar, código G7384, Sigma) con el reactivo 0,2 N FC y se agregó 75 g/mL Na₂CO₃ (código S2127, Sigma). Luego de incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de placas (Tecan, Sunrise). El contenido de polifenoles del EEP se expresa en relación a los equivalentes de ácido gálico (GAE), según $C = C1 \times V/m$, donde C es el contenido de polifenoles totales en mg/g en GAE, C1 es la concentración de ácido gálico establecida en la curva de calibración en mg/mL, V es el volumen de extracto (en 1 mL), y m es la masa de propóleos en gramos.

3.5.2.2. *Determinación de Flavonoides en EEP*

El contenido de flavonoides se realizó mezclando diluciones de EEP o quercetina (estándar, código Q4951, Sigma) con 2 % AlCl₃ (código A0718, Sigma), según se ha descrito previamente²⁷¹. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se midió la absorbancia a 435 nm en lector de placas (Tecan, Sunrise). El contenido de flavonoides en EEP se expresa en relación a los mg de quercetina.

3.5.3. Visualización de nanoformulaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

3.5.3.1. *MET*

Las nanoformulaciones se visualizaron por MET, en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión (UMET) de la Facultad de Ciencias, Udelar, por el método de tinción con ácido fosfotúngstico (PTA) 1% previamente descrito¹³⁸, o con acetato de uranilo 2%. Brevemente, 10 µL de la muestra se colocaron sobre una grilla de 200 Mesh de cobre con film de FormVar carbón FCF-200 Cu 50/pK, y se dejaron secar durante 2 minutos. Se agregaron 10 µL de solución acuosa de PTA 1% o de acetato de uranilo 2%, durante 2 minutos. Luego, se visualizaron con un voltaje de aceleración de -80 kV en un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL, Japón), operado por la Dra. Gabriela Casanova o integrantes de su equipo de la UMET.

3.5.3.2. MET de alta resolución (HR-MET)

Las nanoformulaciones se visualizaron mediante HR-MET en el Laboratorio de Alta Resolución, Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional Este (CURE), Udelar. Para ello se utilizó una grilla de cobre de 300 Mesh con film de Carbón ultrafino (UL) y se realizó una tinción negativa optimizada con 2% de acetato de uranilo acuoso (EMS). Las muestras se visualizaron con un voltaje de aceleración de -200 kV en un Microscopio Electrónico de Alta Resolución JEOL JEM 2100 con una cámara CCD GATAN ORIOUS 1000 sin filtro, operado por el Lic. Álvaro Olivera.

3.5.4. Determinación de la dispersión dinámica de la luz de las nanoformulaciones

Nuestro grupo estableció una colaboración con la Dra. Iris Miraballes de la Plataforma Tecnológica de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP), Facultad de Química, Udelar. Gracias a esta colaboración pudimos determinar la distribución de tamaños de partículas y el potencial zeta (medida de la carga eléctrica) de nuestras nanoformulaciones. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se determinó por el método de Dispersión Dinámica de la Luz (del inglés *Dynamic Light Scattering*, DLS) utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd). Las formulaciones se midieron sin diluir, por triplicado o quintuplicado en una celda de vidrio de apertura redonda (PCS8501, Malvern), utilizando los siguientes parámetros SOP: material RI = 1,59, RI dispersante (agua) = 1,33, T=25 °C, viscosidad (agua) = 0,887 cP, ángulo de medida = 173° de retrodispersión, posición de medida = búsqueda de posición óptima, atenuación automática. Para medir el potencial zeta, las formulaciones se midieron por triplicado o quintuplicado y fueron cargadas en una celda capilar plegada descartable DTS1070 (Malvern instruments, Ltd.) utilizando los siguientes parámetros SOP: material RI = 1,59, RI dispersante (agua) = 1,33, T=25 °C, viscosidad (agua) = 0,887 cP, atenuación y selección de voltaje automática. El diámetro medio Z ponderado por intensidad, PDI y potencial Z de cada formulación se expresan como la media de tres o cinco medidas realizadas $\pm$ la desviación estándar.

3.6. Líneas celulares y cultivos celulares primarios utilizados

3.6.1. Células Vero

Se utilizó la línea celular Vero (ATCC® CCL-81™), gentilmente cedida por la Dra. Verónica Tórtora del Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Udelar. Esta línea consiste en células epiteliales renales derivadas del mono cercopiteco verde (*Cercopithecus aethiops*). Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco modified Eagles minimal essential medium*, por sus siglas en inglés, código DMEM-HA, Capricorn Scientific) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SBF, Fetal Bovine Serum Advanced, collected in South America, código FBS-11A, Capricorn Scientific) y 1X Estreptomicina-Penicilina (código PS-B, Capricorn Scientific), y se incubaron en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO₂. El crecimiento de las células se monitoreó cada 24-48 horas, y se cambió el medio cada 3 o 4 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se procedió a despegarlas con una solución de 0,25 (p/v) de Tripsina y 0,53 mM de EDTA y a expandir el cultivo, de acuerdo al protocolo de Ammerman y colaboradores²⁷². Las células se contaron en microscopio óptico con cámara de Neubauer y tinción con 0,4 % de Trypan Blue (código T8154, Sigma).

3.6.2. Células MDCK

Se utilizó la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK, (NBL-2) ATCC® CCL-34™), gentilmente cedida por la Dra. Pilar Moreno del Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelAR y del Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo. Las células de esta línea son células epiteliales renales derivadas de perra hembra Cocker spaniel (*Canis familiaris*) adulta sana. Las células se cultivaron en medio DMEM (código DMEM- HPSTA, Capricorn Scientific) suplementado con 10 % de SBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific) y 1X Estreptomicina-Penicilina (código PS-B, Capricorn Scientific), y se incubaron en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO₂. El crecimiento de las células se monitoreó cada 24-48 horas, y se cambió el medio cada 3 o 4 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se procedió a despegarlas con una solución de 0,25 (p/v) de Tripsina y 0,53 mM de EDTA (15-20 minutos a 37 °C) y a expandir el cultivo, de acuerdo al protocolo del proveedor (ATCC). Las células se contaron en microscopio óptico con cámara de Neubauer y tinción con 0,4 % de Trypan Blue (código T8154, Sigma).

3.6.3. Células J558

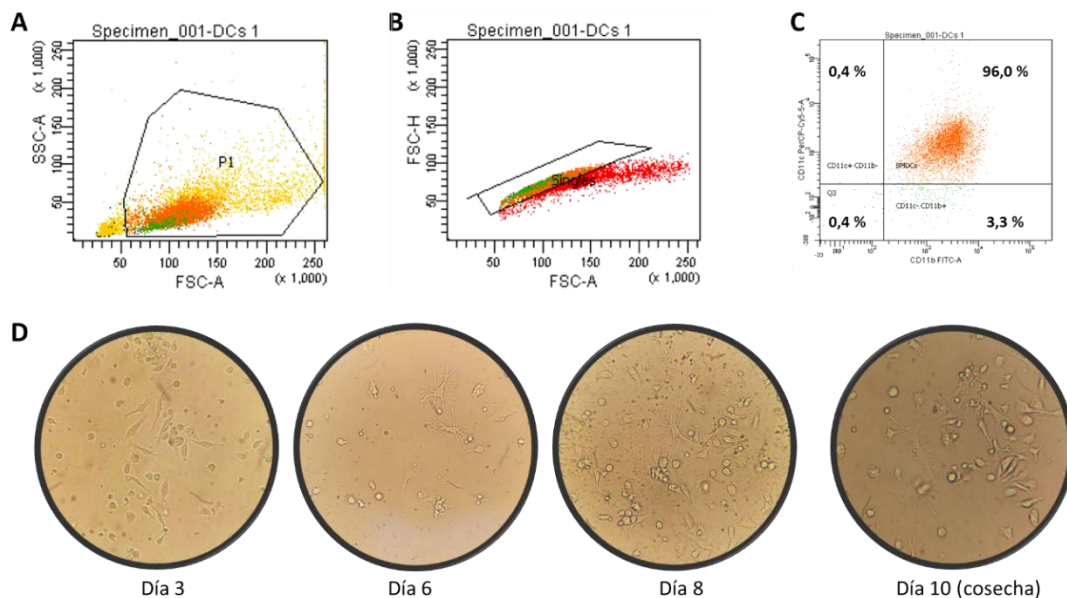
Las células J558 (ATCC® TIB-6™) productoras del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) fueron gentilmente cedidas por la Dra. Cecilia Casaravilla de la Cátedra de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, UdelAR. Estas células son linfoblastos derivados de plasmacitoma de ratón (*Mus musculus*), que han sido modificadas para expresar constitutivamente GM-CSF. Se las cultivó según protocolos establecidos²⁷³. Brevemente, las células se cultivaron en medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, código IMDM-A, Capricorn Scientific) suplementado con 50 µM β-mercaptoetanol (código M3148, Sigma), 1X antibiótico/antimicótico (código AAS-B, Capricorn Scientific), 5% SBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific) *heat inactivated* (hi, 30 minutos 56 °C). Las células se incubaron durante 3 días en cámara húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂, y se procedió a colectar el sobrenadante. Para ello, las células se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró por 0,22 µm (filtro Minisart código 16534-K, Sartorius Stedim Biotech) bajo flujo laminar y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

3.6.4. Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)

La obtención de BMDCs se realizó según el protocolo de Yang y colaboradores²⁷⁴ con modificaciones realizadas por la Dra. Natalia Muñoz Wolf y por nosotros. Brevemente, ratones hembra cepa BALB/c o C57Bl/6J de 6-8 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical. De forma aséptica se extrajeron los fémures y tibias, y se removieron los tejidos que rodean a los huesos. Los huesos fueron sumergidos durante 5 segundos primero en alcohol etílico 70% y luego en medio de cultivo RPMI-1640 (código RPMI-STA, Capricorn Scientific) suplementado con 2,5 g/L de glucosa (código G-7021, Sigma), 10 % de hiSFB (código FBS-11A, Capricorn Scientific), 1X Antibiótico/antimicótico (código AAS-B, Capricorn Scientific), 10 µM HEPES (código HEP-B, Capricorn Scientific), 2 g/L de Bicarbonato de Sodio (código S-5761, Sigma). Se cortaron los extremos de los huesos con un bisturí quirúrgico, y los huesos sin los extremos se volvieron a sumergir 5 segundos primero en alcohol etílico 70 % y luego en medio de cultivo. Se extrajo la médula ósea mediante eyección con jeringa con medio de cultivo y aguja 25G. El material celular fue disgregado mediante pipeteo, hasta lograr una suspensión celular

homogénea. Las células se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se procedió a la lisis de glóbulos rojos resuspendiendo el pellet con 1 mL de 0,88% de cloruro de amonio (código A9434, Sigma) estéril durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la lisis con 30 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer con 0,4 % Trypan Blue (código T8154, Sigma). Para diferenciar las células precursoras de médula ósea en BMDCs, las células se cultivaron a una densidad de 1×10^6 o 4×10^5 células/mL para ratones BALB/c o C57Bl/6J respectivamente, en medio de cultivo suplementado con 10 % de sobrenadante producido por las células J558, y colectado según se describió previamente, de forma de agregar GM-CSF en proporciones adecuadas, durante 10 días, cambiando el medio cada 3 días, en estufa húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. Para determinar el rendimiento de las BMDCs se realizó una fenotipificación por citometría de flujo (CF). Para ello, las células se lavaron con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (código D5652, Sigma), se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se resuspendieron en PBS 2 % hi SFB 25 mM EDTA (FACS buffer) para su tinción con pares de anticuerpos anti-CD11c conjugado a APC (código 117310, Biolegend) y anti-CD11b conjugado a APC/Cy7 (código 101226, Biolegend), o anti-CD11c conjugado a PerCP/Cy5.5 (código 560584, BD Pharmingen) y anti-CD11b conjugado a FITC (código 101206, Biolegend), durante 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron 2 veces con FACS buffer, y se procedió a su análisis en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD). Los datos se analizaron utilizando el software FACSDiva™ versión 6.1.3 (BD). Se identificaron a las BMDCs como aquellas células doble positivas CD11c⁺ CD11b⁺. Para los ensayos posteriores se utilizaron suspensiones celulares con más de 90 % de las células doble positivas CD11c⁺ CD11b⁺. La estrategia de *gating* utilizada para la identificación de BMDCs se muestra en la Figura 14.

La concentración de sobrenadante de J558 a utilizar se determinó mediante una puesta a punto. Para ello se cultivaron los precursores de médula ósea con sobrenadantes colectados a partir de distintas condiciones de cultivo de las J558, y luego de seleccionada la mejor condición, con distintas concentraciones de sobrenadante (2, 5, 10 y 20 %), fenotipificando las células a los 10 días de cultivo mediante CF como se explicó previamente.



J558. Las BMDCs se identificaron como las células doble positivas CD11c⁺ CD11b⁺. En primer lugar, se realizó un gráfico de puntos forward scatter (FSC) en función de side scatter (SSC) para seleccionar a todas las células (A). Se eliminaron los dobletes seleccionando los singuletes (B), y luego se procedió a seleccionar las células CD11c⁺ CD11b⁺ doble positivas (C, cuadrante superior derecho). El resultado mostrado es representativo de varios experimentos independientes. En cada cuadrante se muestra el porcentaje de células sobre el parental (singuletes). Los datos corresponden a un experimento puntual, pero son representativos de los diferentes experimentos independientes. Se muestran las BMDCs en cultivo observadas al microscopio óptico en los diferentes días a medida que avanza la diferenciación (D).

3.6.5. Obtención de esplenocitos murinos

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo el bazo utilizando la técnica aséptica en condiciones de esterilidad. Manteniendo estas condiciones, el bazo fue disgregado con un émbolo de jeringa en un *cell strainer* de 100 μ m (código 352360, BD) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Se lisaron los glóbulos rojos con buffer ACK (0,15 M de NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA disódico, Sigma) durante 1 minuto en hielo. Se detuvo el lisado celular con el agregado de 5 mL de PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (código D5652, Sigma) 20 % SBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, y se lavaron con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺. Las células se contaron en microscopio óptico con cámara de Neubauer y tinción con 0,4 % de Trypan Blue (código T8154, Sigma).

3.6.6. Células de ganglio drenante (dLN) murino

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los ganglios inguinales (drenantes, debido a que los ratones habían sido inoculados por vía s/c en la base de la cola). Para la obtención de suspensiones celulares a partir de dLNs, se disgregaron los mismos entre dos vidrios portaobjeto con buffer PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (código D5652, Sigma). Las células se contaron en microscopio óptico con cámara de Neubauer y tinción con 0,4 % de Trypan Blue (código T8154, Sigma).

3.6.7. Células J774 A.1

Se utilizó la línea celular J774 A.1 (ATCC® TIB-67™) derivada de monocitos/macrófagos murinos (*Mus musculus*). Las células se cultivaron en medio DMEM 4,5 g/L de glucosa (código DMEM-HPSTA, Capricorn Scientific) suplementado con 10 % hiSBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific), y se incubaron en estufa húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. El crecimiento de las células se monitoreó cada 24-48 horas, y se cambió el medio cada 3 o 4 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se procedió a despegarlas con un *cell scraper* y a expandir el cultivo, de acuerdo al protocolo del proveedor (ATCC). Las células se contaron en microscopio óptico con cámara de Neubauer y tinción con 0,4 % de Trypan Blue (código T8154, Sigma).

3.6.8. Líneas celulares reporteras

Las líneas celulares reporteras utilizadas desarrolladas por Invivogen® cuentan con integración cromosomal del constructo reportero de la fosfatasa alcalina embrional secretada (SEAP por sus

siglas en inglés *secreted embryonic alkaline phosphatase*), inducible por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Estas células además expresan Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), que se indican a continuación en la descripción en cada línea celular utilizada. La presencia de agonistas de estos receptores induce las vías de señalización que deriva en la translocación al núcleo de los factores de transcripción mencionados, lo que a su vez promueve la expresión y secreción de la enzima SEAP. Esta expresión, y por lo tanto la interacción de las sustancias de interés con los PRRs mencionados anteriormente, puede ser detectada y cuantificada utilizando el sustrato enzimático QUANTI-Blue™, cuyo procesamiento por parte de la enzima SEAP es detectado mediante colorimetría midiendo la absorbancia a 638 nm en el sobrenadante de las células previamente estimuladas con los SBAs.

3.6.8.1. Células THP1-XBlue™

Las células THP1-XBlue™ (Invivogen®) derivan de la línea celular humana monocítica THP-1 que expresan todos los TLRs, pero solo responden a ligandos para TLR2, TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR5 and TLR8, y son resistentes al marcador de selección Zeocin™. La presencia de agonistas de estos receptores induce las vías de señalización que derivan en la activación de NF- κ B y AP-1, lo cual puede ser detectado como se explicó previamente. El cultivo y los ensayos se realizaron según recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (código R1383, Sigma) suplementado con 4,5 g/L de glucosa (código G8270, Sigma), 1 mM de piruvato de sodio (código P5280, Sigma), 2 mM L-glutamina (AppliChem), 25 mM HEPES (código L0180, Biowest), 10% SBF hi (30 minutos a 56 °C), 100 μ g/ml Normocin™ (Invivogen®), 100 U/ml-100 μ g/ml Estreptomicina-Penicilina (código PS-B, Capricorn Scientific). El crecimiento de las células se monitoreó cada 24-48 horas, y se cambió el medio cada 3 o 4 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se procedió a realizar el ensayo, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La detección del metabolito se realizó a 638 nm en espectrofotómetro de placas (Sunrise, Tecan).

3.6.8.2. Células THP1-XBlue™-defMyD

Las células THP1-XBlue™-defMyD (Invivogen®) son iguales a las células THP1-XBlue™ (Invivogen®), pero son deficientes en actividad de MyD88, y por consiguiente no son capaces de responder a la activación de receptores cuya señalización es dependiente de MyD88, tales como TLR2, TLR4 and IL-1Rs. No obstante, son capaces de responder a la activación de receptores independientes de MyD88 tales como NOD1 y TNFR. En presencia de agonistas de estos receptores se inducen las vías de señalización que derivan en la activación de NF- κ B y AP-1, lo cual puede ser detectado como se explicó previamente. Para cultivarlas se utiliza el mismo protocolo que para las células THP1-XBlue™ descritas previamente, que a su vez se utilizan como control positivo al hacer ensayos con estas células. La detección del metabolito se realizó a 638 nm en espectrofotómetro de placas (Sunrise, Tecan).

3.6.8.3. Células RAW-Blue™

Las células RAW-Blue™ (Invivogen®) son derivadas de macrófagos murinos (*Mus musculus*) RAW 264.7 y sobre-expresan constitutivamente todos los TLRs (a excepción de TLR5), así como también RIG-I, MDA-5, NOD1, NOD2 y Dectina-1 endógena. La presencia de agonistas de estos receptores induce las vías de señalización que derivan en la activación de NF- κ B y AP-1, lo cual

puede ser detectado como se explicó previamente. Esta línea celular se cultivó en medio DMEM 4,5 g/L glucosa (Capricorn Scientific), suplementado con 10 % de SBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific), 2mM L-glutamina (AppliChem), 100 µg/ml Normocin™ (Invivogen®), 1X Estreptomicina-Penicilina (código PS-B, Capricorn Scientific), y 200 µg/ml Zeocin™ (Invivogen®), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. El crecimiento de las células se monitoreó cada 24-48 horas, y se cambió el medio cada 3 o 4 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se procedió a realizar el ensayo. Para ello se siguieron las recomendaciones del fabricante y se utilizó el mismo medio de cultivo, con la variante de que el SBF utilizado fue hi (56 °C durante 30 minutos). La detección del metabolito se realizó a 638 nm en espectrofotómetro de placas (Sunrise, Tecan o Dynex technologies).

3.7. Animales de experimentación

Todos los ensayos con animales de experimentación llevados a cabo en este trabajo fueron realizados según protocolos previamente aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), siguiendo estrictos lineamientos de bienestar animal, y las normas de ética recomendadas para el cuidado y trabajo con animales de experimentación, siguiendo el principio de las 3Rs (reducción, reemplazo y refinamiento), garantizando el mínimo sufrimiento posible en todos los casos. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Higiene, al cuidado de personal entrenado, dedicado y especializado para ello, siguiendo los protocolos establecidos en dicho bioterio. Brevemente, los animales se mantuvieron en jaulas de plástico con tapa con filtro en racks ventilados, con ciclos de luz/oscuridad 12/12 horas, temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (55 ± 5 %) controladas, y con viruta autoclavada. Recibieron agua y alimento estéril (Ración Especializada Para Lauchas, Vitaron) *ad libitum*. Previo a la realización de los experimentos, los animales se aclimataron durante al menos 7 días. Todas las personas que participaron en los experimentos de este trabajo estaban acreditadas por la CHEA con al menos categoría B (técnico experimentador) o acreditación equivalente. Todos los experimentos con animales de laboratorio se realizaron siguiendo las normas de ética, seguridad y bioseguridad vigentes.

3.7.1. CD1

Los ratones machos y hembras cepa CD1 fueron criados en el bioterio de cría del Instituto de Higiene, separados por sexo y alojados en la sección hotelería del bioterio de experimentación del mismo Instituto a las 6 semanas de edad, hasta su uso.

3.7.2. BALB/c y C57Bl/6J

Los ratones hembras cepas BALB/c y C57Bl/6J de 6-8 semanas de edad fueron adquiridos a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, MGAP), y alojados en la sección hotelería del bioterio de experimentación animal del Instituto de Higiene, hasta su uso.

3.7.3. C57Bl/6 Casp 1/11 knock-out y littermates

Los ratones hembras cepa C57Bl/6 *knock-out* para los genes de Caspasa 1 y Caspasa 11 (Casp1/11 *ko*), y sus *littermates wild type* (*wt*) de 6-8 semanas de edad fueron adquiridos al Institut Pasteur de Montevideo, y alojados en la sección hotelería del bioterio de experimentación animal del Instituto de Higiene, hasta su uso.

3.8. Ensayos de toxicidad

3.8.1. Toxicidad *in vitro*: hemólisis

La actividad hemolítica de las saponinas es uno de los principales indicadores de toxicidad. Se realizó un análisis comparativo entre la hemólisis inducida por las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* y la saponina comercial QuilA® (Brenntag Biosector). Se evaluaron distintas concentraciones de las distintas fracciones de saponinas, del EEP y de las nanoformulaciones, según se indica en cada caso, en una solución de eritrocitos de conejo o de ratón al 1 %, según protocolos establecidos en nuestro laboratorio y reportados previamente²⁷⁵. Brevemente, se colocaron 20 μ L de la solución a ensayar en una placa de aglutinación de fondo curvo de 96 wells (código 900010, Deltalab S.L., Barcelona, España), se agregaron 180 μ L de una solución de eritrocitos de conejo o de ratón al 1 % y se incubaron 30 minutos a 37 °C. Se centrifugó la placa a 2500 rpm durante 6 minutos. Se transfirieron 100 μ L de sobrenadante a una placa de 96 wells de fondo plano (código 900011, Deltalab S.L., Barcelona, España), y se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro de placas (Tecan, Sunrise). Las soluciones de suero fisiológico y de 250 μ g/mL de QuilA® se consideraron como 0 y 100 % de hemólisis, respectivamente. Todas las muestras se ensayaron por triplicado. La actividad hemolítica se expresó como la concentración capaz de inducir hemólisis en 50 % de los eritrocitos (HD₅₀).

3.8.2. Toxicidad *in vitro*: ensayo de MTT

Se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante la técnica colorimétrica de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)²⁷⁶. Esta reducción es realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, transformando el MTT en formazán, un compuesto de color azul. De esta manera se determina la funcionalidad de las células tratadas, permitiendo medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado, y la presencia de éste se puede detectar por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 570 nm. Para determinar la citotoxicidad de las fracciones de saponinas, las nanoformulaciones y los EEP, se realizó este ensayo en células Vero, MDCK, J774 A.1, RAW-Blue™ y BMDCs, en presencia de diferentes concentraciones de estos compuestos. Brevemente, las células se cultivaron en medio DMEM (código DMEM-HA, Capricorn Scientific) suplementado con 10 % de SBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific) y antibióticos (penicilina UI/mL; estreptomycin 100 μ g/mL). Se sembraron $4,0 \times 10^4$ células por well en placas de cultivo de 96 wells (Cellstar® código 655 180, Greiner bio-one), y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 36-48 horas. Se reemplazó el medio de cultivo por DMEM suplementado conteniendo las distintas formulaciones a ensayar, y se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 5% CO₂. Se retiró el medio, se lavaron las células con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (código D5652, Sigma), se agregaron 100 μ L/well de una solución 2 mg/mL de MTT (código M5655, Sigma). Luego de 4 horas de incubación a 37 °C y 5% CO₂, se descartó el MTT no transformado por las células y se agregaron 100 μ L/well de etanol absoluto para disolver los cristales de formazán. Luego de 15 minutos, se determinó la concentración del formazán en solución etanólica por espectrofotometría a $\lambda = 570$ nm, siendo la cantidad de formazán producido directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Los resultados se expresan como el porcentaje de las células viables en comparación con el OD de las células no tratadas, que se considera 100 % de viabilidad.

3.8.3. Toxicidad *in vivo*: ensayos de toxicidad aguda

3.8.3.1. Toxicidad aguda de fracciones de saponinas

La toxicidad aguda de las distintas fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* y de QuilA® se evaluó en ratones macho cepa CD1 de 8 semanas de edad, como se ha descrito previamente¹³⁸. Brevemente, se inocularon los ratones (n=5) por vía subcutánea (s/c) en la región interescapular con 100 µL de distintas concentraciones de las soluciones a testear (150, 75, 37,5 y 18,75 µg/ds). La toxicidad aguda desencadenada por las fracciones de *Q. brasiliensis* y QuilA®. Al grupo control se le inyectaron 100 µL de solución salina estéril. Se monitorearon los animales cada 24 hs durante 72 hs, evaluando signos de toxicidad tales como inflamación local, piloerección, pérdida de pelo, o letalidad. Este ensayo se realizó de acuerdo a los códigos de ética vigentes, y el protocolo correspondiente fue evaluado y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), exp. N° 070153-000531-13, y por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina (Registro Institucional ante la CNEA N° 0011/11).

3.8.3.2. Toxicidad aguda de nanoformulaciones

La toxicidad aguda *in vivo* se evaluó en ratones hembra cepa CD1 de 22-25 g de peso, como se ha descrito previamente¹³⁸. Brevemente, se inocularon los ratones (n=5) por vía sub-cutánea en la región interescapular con 100 µL de 2 concentraciones distintas de las nanoformulaciones a testear: ISCOMs con 10 ó 30 µg/ds QB90 de *Q. brasiliensis* y 10 o 30 µg/ds ovoalbúmina como antígeno (OVA), e ISCOMPro, que además de QB90 y OVA contenían EEP (48 y 144 µg/ds respectivamente). Al grupo control se le inocularon 100 µL de PBS. Los animales se monitorearon cada 24-72 hs durante 12 días, evaluando signos de toxicidad locales y sistémicos tales como movilidad general, inflamación o reacción local, piloerección, pérdida de pelo, o letalidad. Además, se monitoreó la evolución del peso de los animales. Las concentraciones de cada formulación (ISCOMs e ISCOMPro) se seleccionaron considerando testear la toxicidad por encima de las cantidades que se inocularán en el esquema de vacunación (2 dosis, *priming* y *booster*, separadas 14 días, conteniendo cada una 10 µg/ds de QB90, 10 µg/ds de OVA y 48 µg/ds de propóleos). Este ensayo se realizó de acuerdo a los códigos de ética vigentes, y el protocolo correspondiente fue evaluado y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), protocolo N° 541.

3.9. Estudio de la respuesta inmune innata

3.9.1. Reclutamiento celular a tiempos tempranos

Para estudiar qué tipo de células son reclutadas en los órganos linfoides secundarios a tiempos tempranos, se inocularon ratones cepa BALB/c con 100 µL por vía s/c en la base de la cola con las formulaciones basadas en saponinas conteniendo 10 µg/ds de QB90 o QuilA®, o 2,5 µg/ds de dichas saponinas en sus IMX. Luego de 6 y 24 horas, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se extrajeron los dLNs (inguinales) y los bazo, y a partir de ellos se obtuvieron las suspensiones celulares y los esplenocitos como se explicó previamente.

Se procedió a la tinción de superficie con un panel de anticuerpos de citometría para granulocitos y otro para linfocitos, según se muestra en la Tabla 2. Se tiñeron 1×10^6 esplenocitos y 5×10^5 células de dLNs con cada panel. La tinción se realizó durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad, y posteriormente las células se lavaron con buffer FACS para eliminar el exceso de

anticuerpos. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto II, y el procesamiento de los datos se realizó con el software FACSDiva™ versión 6.1.3 (BD). La estrategia de *gating* utilizada para la identificación de las poblaciones de linfocitos y granulocitos se muestra en las Figuras 15 y 16 respectivamente.

Tabla 2. Paneles utilizados para inmunofenotipificación de células reclutadas en bazo y dLN a tiempos tempranos.

Panel	Anticuerpos
Linfocitos	Anti-CD3-FITC (código 100306, Biolegend)
	Anti-CD8a-PE/Cy7 (código 100722, Biolegend)
	Anti-CD19-APC (código 115512, Biolegend)
	Anti-CD4-APC/Cy7 (código 100414, Biolegend)
	Anti-CD49b-PE (código 553858, BD Pharmingen)
Granulocitos	Anti-Gr1-FITC (código 108406, Biolegend)
	Anti-MHC II I-A ^d -PE (código 553548, BD Pharmingen)
	Anti-CD11b-APC/Cy7 (código 101226, Biolegend)
	Anti-CD11c-PerCP/Cy5.5 (código 560584, BD Pharmingen)
	Anti-F4/80-Pacific Blue (código 123124, Biolegend)
	Anti-CD169-APC (código 142417, Biolegend)

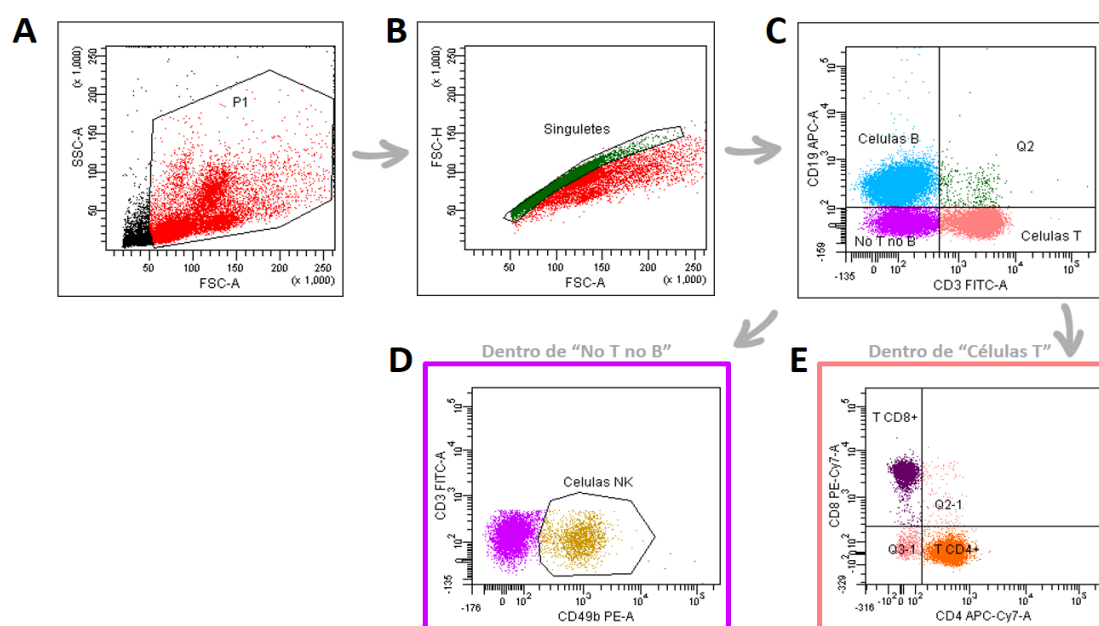


Figura 15. Estrategia de gating para inmunofenotipificación de linfocitos por citometría de flujo. En primer lugar, se realizó un gráfico de puntos forward scatter (FSC) en función de side scatter (SSC) para seleccionar a todas las células (A). Se eliminaron los dobletes seleccionando los singletes (B). A partir de este gate, se identifican las siguientes poblaciones celulares: linfocitos B como $CD19^+ CD3^-$ (C, cuadrante superior izquierdo), linfocitos T como $CD19^- CD3^+$ (C, cuadrante inferior derecho). Dentro de las células doble negativas $CD19^- CD3^-$ (C, cuadrante inferior izquierdo), se identifica a las células NK como a las $CD49b^+$ (D). Dentro de los linfocitos T, se identifica a los T $CD8^+$ (E, cuadrante superior izquierdo), y a los T $CD4^+$ (E, cuadrante inferior derecho).

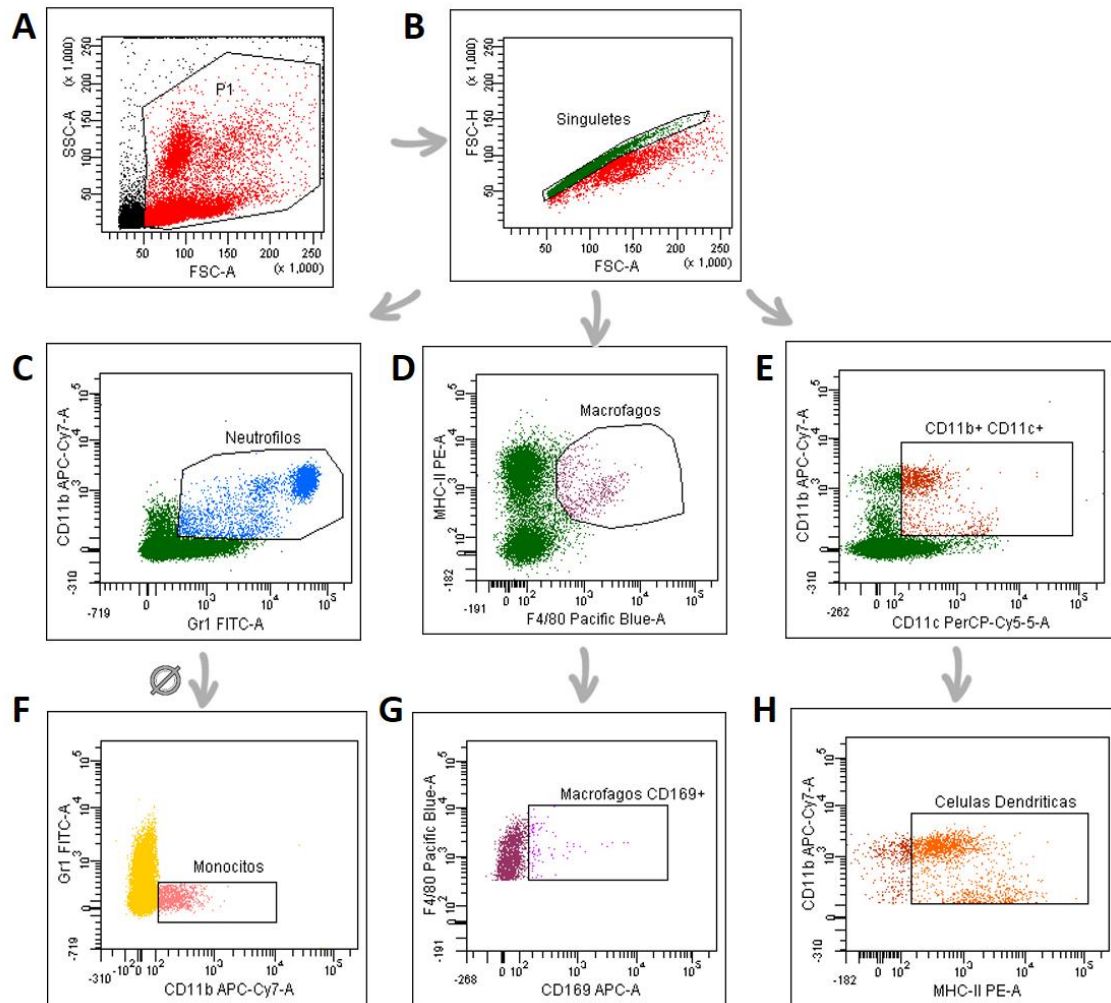


Figura 16. Estrategia de gating para inmunofenotipificación de granulocitos por citometría de flujo. En primer lugar, se realizó un gráfico de puntos forward scatter (FSC) en función de side scatter (SSC) para seleccionar a todas las células (A). Se eliminaron los dobletes seleccionando los singletes (B). A partir de este gate, se identificaron las siguientes poblaciones celulares: neutrófilos como $Gr1^+ CD11b^+$ (C), macrófagos como $MHC-II^+ F4/80^+$ (D) y células $CD11b^+ CD11c^+$ (E). Se identifican a los monocitos como a las células $CD11b^+$ en el inverso del gate de los neutrófilos (F). Dentro del gate de macrófagos, se identifican a los macrófagos $CD169^+$ (G). Dentro del gate de las células $CD11b^+ CD11c^+$, se identifica a las células dendríticas (DCs) como $MHC-II^+$ (H).

3.9.2. Activación de macrófagos y BMDCs por citometría de flujo

Para evaluar la capacidad de las formulaciones de interés en estimular células presentadoras de antígeno (APC), se estudió por citometría de flujo la activación de moléculas co-estimuladoras (MHC-II, CD40, CD80 y CD86) en macrófagos J774A.1 y BMDCs. Para ello, se sembraron 450 μ L de una suspensión de 4×10^5 células/mL por well en placas de 24 wells (código 662 160 Cellstar®, Greiner bio-one) y se incubaron durante 1 hora en estufa húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. Luego se agregaron 50 μ L de las formulaciones de interés por triplicado con 1 μ g/mL para J774 A.1 o 0,625 μ g/mL para BMDCs de las fracciones QB80, QB90, QuilA®, o sus IMX con la misma concentración de saponinas. Como control positivo se utilizó LPS (0,1 μ g/mL). Las placas se incubaron durante 24 horas en estufa húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. Al finalizar la incubación, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, y los sobrenadantes se colectaron y guardaron a -80 °C para el posterior análisis de determinación de citoquinas proinflamatorias. Las células se

lavarón con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (código D5652, Sigma) y se resuspendieron en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (código D-5652, Sigma) 2% hiSBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific) 25 mM EDTA (FACS Buffer). Las células se dividieron en 2, y se realizó la tinción de superficie con los 2 paneles anticuerpos monoclonales de citometría. Por un lado, se tiñeron con anti-CD80 conjugado a FITC (código 553768, BD Pharmingen), anti-CD86 conjugado a PE (código 105007, Biolegend), y por otro lado con anti-MHC-II conjugado a PE (código 553548, BD Pharmingen) y anti-CD40 conjugado a FITC (código 553790, BD Pharmingen), en oscuridad a 4 °C durante 30 minutos. En el caso de las BMDCs, en cada panel se incluyeron además anticuerpos anti-CD11b conjugado a APC/Cy7 (código 101226, Biolegend) y anti-CD11c conjugado a APC (código 117310, Biolegend) para identificar a las BMDCs. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto II, y el procesamiento de los datos se realizó con el software FACSDiva™ versión 6.1.3 (BD). La estrategia de *gating* para cada panel se realiza según se indica en la Figura 17. En el caso de las BMDCs, se realiza la estrategia de *gating* de la Figura 14, y a partir del gate “BMDCs” se seleccionan las células positivas para cada fluoróforo.

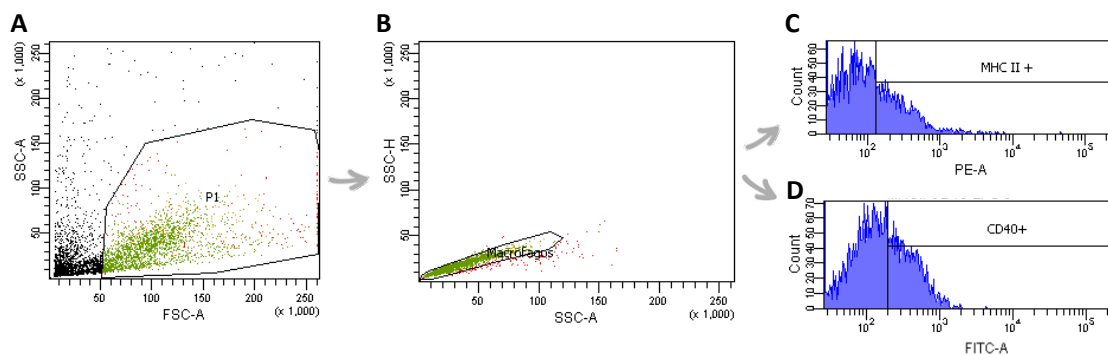


Figura 17. Estrategia de *gating* para evaluación de expresión de moléculas co-estimuladoras. En primer lugar, se realizó un gráfico de puntos forward scatter (FSC) en función de side scatter (SSC) para seleccionar a todas las células (A). Se eliminaron los dobletes seleccionando los singuletes (B, gate “Macrófagos”), y a partir de este gate se procedió a seleccionar las células poblaciones celulares positivas para cada fluoróforo, por ejemplo, las células positivas para MHC-II-PE (C) o para CD40-FITC (D), según los controles FMO correspondientes.

3.9.3. Producción de óxido nítrico en macrófagos

Para evaluar si las formulaciones son capaces de inducir la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos, se utilizó la reacción de Griess^{266,277,278}. Esta técnica espectrofotométrica permite cuantificar indirectamente el NO en el sobrenadante de cultivo, debido a que el NO reacciona con el oxígeno originando nitrito (NO^2) y nitrato (NO^3), ambos estables y no volátiles. El nitrito en medio ácido reaccionará con la sulfanilamida, formando la sal de diazonio. Esta sal se une a N-(1-naftil)-etilendiamina (NEDA) formando un compuesto de color púrpura que es detectado por espectrofotometría a 540 nm.

Para realizar este ensayo, se cultivaron 200 μL de una suspensión de $5,5 \times 10^5$ células/mL de macrófagos murinos J774A.1 por well en placas de 96 wells durante 24 horas en estufa húmeda a 37 °C y 5 % de CO_2 . Se retiraron 100 μL /well de medio de cultivo, y se agregaron 10 μg /mL de QB90, QuilA® o sus IMX conteniendo la misma concentración de saponinas por triplicado en 50 μL /well de medio DMEM suplementado con 5 % hiSBF (código FBS-11A, Capricorn Scientific) y 7,5 mM de L-arginina (código A8094, Sigma). Como control positivo, se estimularon los macrófagos con 1 μg /mL de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (código L-4391, Sigma) y 100 U/mL de IFN- γ (código 01-172, Sigma) en 50 μL del mismo medio. Como control negativo se incluyeron

células sin estimular (sólo se les agregó el mismo volumen de los estímulos con PBS). Las células se incubaron durante 48 horas en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO₂. Las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, se guardaron 40 µL de sobrenadante a –80 °C, y se sembraron 50 µL de sobrenadante por duplicado en placa de 96 wells de fondo plano. En dicha placa también se incluye una curva de calibración de nitrito de sodio (NaNO₂, código 237213, Sigma Aldrich) de 1,6 a 100 µM. Se agregaron 50 µL/well de reactivo de Griess (50:50 2 % sulfanilamida (código S-9251, Sigma) en 30 % ácido acético:0,2 % NEDA (código 33461, Sigma Aldrich) en 60 % ácido acético, v/v). Se incubó durante 20 minutos en oscuridad, y se realizó la lectura a 540 nm en espectrofotómetro de placas. Se determinó la concentración de nitratos en los sobrenadantes de macrófagos en presencia de las distintas formulaciones intrapolando el resultado de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta de la curva de calibración realizada.

3.9.4. Determinación de la concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivos

La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivos celulares estimulados con los distintos SBAs se determinó mediante kits de ELISA o kits de citometría multiplex, según se indica en la Tabla 3, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se utilizaron sin diluir. Todos los sobrenadantes se mantuvieron a -80°C desde su inmediata obtención hasta su uso para determinación de concentración de citoquinas, y una vez descongelados no se volvieron a congelar ni a utilizar.

Tabla 3. Kits utilizados para la determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos estimulados con SBAs.

Método	Citoquina(s) a determinar	Kit utilizado
ELISA	IFN-γ	ELISA MAX TM Mouse IFN-γ standard set código 430801, Biolegend
ELISA	IL-10	ELISA MAX TM Mouse IL-10 standard set código 431411, Biolegend
ELISA	IL-1β	ELISA MAX TM Mouse IL-1β standard set código 432601 o 432602, Biolegend
ELISA	IL-17A	ELISA MAX TM Mouse IL-17A standard set código 432501, Biolegend
ELISA	IL-2	ELISA MAX TM Mouse IL-2 standard set código 431001, Biolegend
ELISA	IL-4	ELISA MAX TM Mouse IL-4 standard set código 431101, Biolegend
ELISA	IL-12p70	ELISA MAX TM Mouse IL-10 deluxe set código 433604, Biolegend
Citometría	IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-17A, IL-10	BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit. Código 560485, BD. Software para análisis de datos: BD CBA Software.
Citometría	IL-23, IL-1α, IFN-γ, TNF-α, MCP-1, IL-1β, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-27, IL-17A, IFN-β, GM-CSF	LEGENDplex TM Mouse Inflammation Panel (13-plex). Código 740150, Biolegend. Software para análisis de datos <i>LEGENDplexTM analysis software</i> Versión 2021-07-01 (57927), Powered by QOGNIT, Biolegend.

3.9.5. Estudio de internalización y procesamiento de antígeno

Para estudiar la internalización y el posterior procesamiento del antígeno se estimularon BMDCs con el antígeno DQ-OVA (código D12053, Molecular Probes, Life Technologies) junto a las

formulaciones de interés. El antígeno DQ-OVA consiste en OVA naturalmente glicosilada, por lo que es un ligando del receptor de manosa, que además tiene conjugado un fluoróforo BIODIPY® con capacidad de auto-*quenching*. Cuando el antígeno es internalizado por la vía fagocítica y degradado en condiciones ácidas por las enzimas lisosomales, el fluoróforo emitirá una señal que puede ser detectada en el canal de FITC. En etapas posteriores, cuando los fragmentos de proteólisis se acumulan en compartimentos lisosomales, el fluoróforo formará excímeros que exhiben fluorescencia y pueden ser detectados en el canal de PE. Es importante destacar que el fluoróforo BIODIPY® está especialmente diseñado para el estudio del procesamiento y presentación de antígenos, ya que, gracias a su tecnología, la fluorescencia que emite no es dependiente del pH, y por lo tanto ésta no se ve afectada por el cambio del pH al que es sometido el antígeno en las vesículas lisosomales.

Para este estudio se obtuvieron BMDCs murinas, y se sembraron 450 μL de 2×10^5 células/mL por well en placas de 24 wells (código 662 160, Cellstar® Greiner bio-one) y se incubaron durante 1 hora en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO_2 . Luego se agregaron en un volumen de 50 μL /well por triplicado 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las fracciones de saponinas o de sus nanoformulaciones junto a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DQ-OVA en medio de cultivo de BMDCs. Las placas se incubaron en 3 condiciones: 15 minutos a 37 °C y 5 % CO_2 , para evaluar la internalización y el procesamiento temprano; 24 horas a 37 °C y 5 % CO_2 , para evaluar la internalización y el procesamiento tardío; y 24 horas a 4 °C como control de la endocitosis basal e interacciones inespecíficas. Se lavaron los wells con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (código D5652, Sigma) para eliminar el exceso de DQ-OVA no fagocitada, y se evaluó la internalización y el procesamiento antigénico por citometría de flujo en los canales FITC y PE como se explicó previamente.

Es importante destacar que previo a la estimulación se identificó que más del 90% de las células derivadas de médula ósea eran $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$, es decir, BMDCs.

3.9.6. Interacción de formulaciones con receptores de la inmunidad innata

Para estudiar si la estimulación del sistema inmune innato por parte de las formulaciones depende de la molécula adaptadora MyD88, se estimularon 2×10^5 células (200 μL de una suspensión de 1×10^6 células/mL) células THP1-XBlue™ (Invivogen®) y THP1-XBlue™-defMyD (Invivogen®) con QB90 o IMXQB90 (0,390 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de saponinas) ON en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO_2 . Se realizaron 6 réplicas de cada muestra. Para estudiar si las formulaciones de interés son agonistas de distintos receptores de la inmunidad innata, se estimularon $9,9 \times 10^4$ células/well (180 μL de $5,5 \times 10^5$ cels/mL) de la línea celular reportera RAW-Blue™ (Invivogen®) con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las siguientes fracciones de saponinas o sus IMX: QB90, QB80 y QuilA® durante 24 horas en estufa húmeda a 37 °C y 5 % CO_2 .

En ambos casos para realizar la detección del metabolito se siguieron las recomendaciones del fabricante. La lectura del ensayo se realizó a 638 nm en un espectrofotómetro de placas (Sunrise, Tecan o Dynex).

3.9.7. Estudio de la activación del inflamasoma en células dendríticas

Se obtuvieron células BMDCs a partir de precursores de médula ósea de ratones cepa C57Bl/6J Casp1/11 *knock-out* (ko) y *wild-type* (wt) como se explicó previamente (sección 3.6.4). Luego, 4×10^4 BMDCs/well fueron estimuladas 10,0; 2,0 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las distintas fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* y sus nanoformulaciones (ISCOMATRIX), por triplicado. También se realizó esta estimulación previa estimulación con LPS (10 ng/mL) durante 2 horas a 37 °C y 5 %

CO₂. Como control positivo, se estimularon BMDCs con hidróxido de aluminio (50 µg/mL) y LPS (10 ng/mL).

Luego se colectó el sobrenadante de cultivo y se cuantificó la cantidad de IL-1β secretada por las BMDCs estimuladas con las distintas formulaciones mediante un kit de ELISA comercial (ELISA MAXTM Standard Sets Mouse IL-1β, código 432602, Biolegend) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante.

3.10. Estudio de la respuesta inmune adaptativa y de la protección conferida por SBAs de *Q. brasiliensis*

Se estudió la respuesta inmune adaptativa desencadenada en modelo murino por las formulaciones basadas en saponinas cuando se incluían en vacunas experimentales contra un antígeno parasitario (*F. hepatica*) y contra un antígeno viral (Influenza). Para ello, se realizaron ensayos de vacunación en ratones, y a partir de éstos se estudió la respuesta humoral y celular desencadenada luego de la vacunación. En todos los casos se comparó la respuesta desencadenada por las formulaciones conteniendo adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* contra adyuvantes basados en saponinas comerciales de *Q. saponaria* (QuilA[®]), contra grupos vacunados solo con antígeno (y sin adyuvantes), y grupos control sin inocular (inoculados con buffer PBS o TRIS).

Todas las formulaciones fueron preparadas en condiciones asépticas y esterilizadas por filtración (filtro 0,22 µm Minisart código 16534-K, Sartorius Stedim Biotech) bajo flujo laminar. Luego de formuladas, las vacunas experimentales se mantuvieron a 4 °C hasta su uso, y fueron adecuadamente homogeneizadas previo a su inoculación.

Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con los códigos de ética vigentes, y los protocolos correspondientes fueron evaluados y aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), y por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina, UdelAR, Exp. N° 070153-000310-17 (ensayos de vacunación con antígeno *FhLAP* y desafío con *F. hepatica*), N° 541 (Ensayo de vacunación con ISCOMPro), N° 468 (ensayos de vacunación y protección con influenza).

3.10.1. Ensayo de vacunación con antígeno parasitario

Para evaluar la respuesta inmune desencadenada por las formulaciones conteniendo adyuvantes de interés frente a un antígeno parasitario, se realizaron dos ensayos de vacunación en ratones con estos adyuvantes y el antígeno de *Fasciola hepatica* *FhLAP*. En cada uno de los ensayos se evaluaron distintas fracciones de *Q. brasiliensis* y sus nanoformulaciones.

Se evaluó la respuesta desencadenada por Fracción b (Fb) y sus ISCOMs, y se comparó con la inducida por formulaciones conteniendo el adyuvante QuilA[®] usado comercialmente. En este ensayo se inocularon 7 grupos de ratones hembra cepa CD1 (n = 6) de 6 semanas de edad con 100 µL por vía s/c en la región interescapular de las distintas formulaciones a ensayar: ISCOMs formulados con Fb de *Q. brasiliensis* en 3 concentraciones diferentes: 10 µg/ds de Fb y de antígeno ("ISCOMs"), 5 µg/ds de Fb y 10 µg/ds de antígeno ("ISCOMs 5"), 2,5 µg/ds de Fb y 5 µg/ds de antígeno ("ISCOMs 5/2"), formuladas mediante el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹ descripto previamente, con el antígeno *FhLAP* incorporado. Además, se inocularon los siguientes grupos: Fracción B (10 µg/ds, "Fb"), y QuilA[®] (10 µg/ds), todos conteniendo 10 µg/ds de antígeno. Como controles se inoculó un grupo solo con el antígeno *FhLAP* (10 µg/ds), y otro grupo con solución buffer sin antígeno ("Tris"). Los animales recibieron el *priming* (d0) y 3 *boosters* (d14, d28 y d70). Se tomaron muestras de sangre por la vena retro-orbital cada 14 días

hasta el día 84 inclusive. Las muestras se colocaron a 37 °C durante 1 hora, y luego 30 minutos a 4 °C. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 6 minutos, y el suero se almacenó a -20 °C hasta su uso. Al d84 se realizó un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH), inoculando por vía intradérmica 1 µg de *FhLAP* en la pata posterior derecha (n=3). Al d86 se realizó el sacrificio por el método de dislocación cervical, y se obtuvieron los bazo asépticamente, para luego evaluar la linfoproliferación y la concentración de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos.

3.10.2. Ensayo de vacunación y desafío con antígeno parasitario

Para evaluar la protección conferida por las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* se realizó un ensayo de vacunación y desafío. En este ensayo se evaluó la capacidad adyuvante y de protección frente al desafío de la fracción QB80 (producida por nuestros colaboradores de la UFRGS), sus nanoformulaciones y los ISCOMPro en modelo murino. Los ratones hembra cepa CD1 de 6-8 semanas de edad (n = 11) fueron inoculados por vía s/c en la región interescapular a d0 y d28 con 100 µL/ds de una de las siguientes formulaciones: ISCOMs de *Q. brasiliensis* conteniendo 44 µg/ds de propóleos y 10 µg/ds de QB80 y de antígeno *FhLAP* ("ISCOMPro"), ISCOMs de *Q. brasiliensis* conteniendo 10 µg/ds de QB80 y de antígeno *FhLAP* ("ISCOMs"), 10 µg/ds de QB80 y de antígeno *FhLAP* ("QB80"), 10 µg de antígeno *FhLAP* ("LAP"), y PBS como control *mock*. Todas las formulaciones tipo ISCOMs fueron formuladas por el método de inyección rápida de etanol descrito previamente¹⁷⁹. Se tomaron muestras de sangre cada 14 días desde el día 0 hasta el día 56, y a tiempo final (d101) para evaluación de la respuesta humoral. El suero extraído se almacenó a -20 °C hasta su uso. Al d56 se realizó un ensayo de DTH (n=3), y se procedió al desafío del resto de los animales (n=8).

El d57 se desafían los ratones previamente vacunados (y que no se les efectuó el ensayo de DTH, n=8) por vía oral (mediante sonda intragástrica) con 25 a 30 metacercarias con 18 % de viabilidad en 400 µL de buffer PBS, obtenidas de Laboratorio "Dr. Miguel C. Rubino", DILAVE, MGAP. La determinación de la viabilidad de las metacercarias fue realizada por la Dra. Gabriela Maggioli, y la inoculación intragástrica de las mismas fue realizada por Lic. Cecilia Salazar de la Unidad de Biología Parasitaria (UBP), Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Udelar y por el Dr. Fernando Silveira. Los animales se mantuvieron en observación durante 45 días. Se evaluó la sobrevida y desarrollo de síntomas (piloerección, cambios en el peso corporal y en la movilidad) semanalmente hasta el d21 post desafío, y luego diariamente hasta el día final. Al día 45 post desafío se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se realizó la necropsia, y se evaluó: el desarrollo de hepatomegalia (volumen y peso del hígado) o esplenomegalia (área y peso del bazo), el daño hepático (mediante el *score* que se indica a continuación), distensión abdominal (medida del ancho del peritoneo previo a la necropsia), recuperación de *F. hepatica* en estado adulto, y presencia de huevos. Para determinar el daño hepático se extrajeron los hígados, se separaron en lóbulos (derecho, izquierdo, caudado y cuadrado), y se diseñó un *score* de daño hepático en función del porcentaje de la superficie de cada lóbulo cubierta con fibrosis o necrosis, de la siguiente manera:

- 0 punto: Sin daño.
- 1 punto: Daño leve, hasta 20% de cobertura del lóbulo.
- 2 puntos: Daño moderado, hasta 60% de cobertura.
- 3 puntos: Daño severo, más del 60% de cobertura

El daño total del hígado se calculó sumando el daño de los cuatro lóbulos.

3.10.3. Ensayos de vacunación con antígeno viral de Influenza

Para evaluar la respuesta humoral y celular desencadenada por las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* frente a un antígeno viral se realizaron ensayos de vacunación con formulaciones conteniendo antígenos del virus de influenza, obtenidos de una de las 2 vacunas comerciales trivalentes fragmentadas e inactivadas (TSIV) contra la influenza estacional: la vacuna producida por el Instituto Butantan contra la influenza estacional (cepas 2016), o Vaxigrip® (Sanofi Pasteur, cepas 2018). Los ratones se inocularon con 100 µL por vía s/c en la región interescapular o 15 µL por vía i/n (previamente anestesiados con 200 µL ketamina-xilacina (200mg/kg - 10 mg/kg respectivamente) por vía intraperitoneal) con una de las formulaciones conteniendo 7,5 µg/ds de HA total del antígeno de influenza y 5 µg/ds de saponinas en forma soluble o en NPs tipo ISCOMs o IMX, o sólo con el antígeno de influenza (Flu, conteniendo 7,5 µg/ds de HA total) o suero fisiológico (SF) o PBS como control negativo. Los animales recibieron un *priming* (al d0) y un *booster* al d14. Las características de los animales inoculados (cepa, sexo, edad y número), el origen de las saponinas utilizadas, el método de formulación de las NPs y los grupos inoculados en cada ensayo se indican en la Tabla 4. Se tomaron muestras de sangre por la vena retro-orbital o sub-mandibular para obtención del suero previo a las inoculaciones desde el día 0, y cada 14 días hasta el fin del ensayo o hasta la realización del desafío, y se procedió como se describió anteriormente.

3.10.4. Desafío con el virus de influenza

El virus de influenza (cepas A/Brazil/G3P1/2013 (H1N1; número de acceso GenBank: KP027598-KP027605 y A/Uruguay/897/2018 (H1N1)pdm09-like virus) fue cultivado en células MDCK (80% de confluencia) en presencia de la enzima N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK, 5 µg/mL) durante 1 hora a 37 °C y 5% CO₂. Luego se agregó medio DMEM con TPCK (1 µg/mL), y se monitoreó el efecto citopático (CPE). Cuando éste fue aproximadamente del 80 %, se recuperaron los sobrenadantes, y se procedió a la titulación de la carga viral, según procedimientos estándar.

Los animales vacunados fueron desafiados 14 días luego del booster con el virus de influenza previamente titulado, por vía i/n (25 µL/narina). La dosis del desafío fue 1×10^3 UFP en el caso de desafío sub-letal, y 1×10^6 TCID₅₀/50 µL en el caso de desafío letal. Para realizar la inoculación y el desafío por vía i/n, los animales se anestesiaron con 200 µL ketamina-xilacina por vía intraperitoneal. Los animales se monitorearon diariamente durante 14 días post-desafío, y se evaluó el peso corporal y la sobrevivencia. Cuando los animales alcanzaban una disminución en su peso corporal del 80% respecto al día del desafío eran sacrificados por dislocación cervical, de acuerdo a los protocolos de ética vigentes en el modelo murino de infección con influenza.

Tabla 4. Ensayos de vacunación y protección en ratones realizados con el antígeno de influenza.

Ensayos de vacunación con influenza	Formulaciones ensayadas	Origen de las fracciones de saponinas de <i>Q. brasiliensis</i>	Método de formulación de NPs	Antígeno utilizado	Vía de inoculación	Ratones (cepa, sexo, edad)	Desafío	Esquema de vacunación y duración del ensayo
Evaluación a corto plazo	IMXQB90, IMXQB80, IMXQuilA®, y fracción QB90, Flu, SF (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nosotros en nuestro laboratorio	Diálisis (el antígeno se incorpora por mezcla simple previo a la inoculación)	Vaxigrip®, 7,5 µg/ds de HA total.	s/c	BALB/c, hembras, 12 semanas de edad, n=5	No	Priming: d0; booster: d14 Desafío: no aplica Fin del ensayo: d28 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Evaluación de la repuesta frente a la inoculación por diferentes vías, efecto <i>dose-sparing</i> , y frente al desafío subletal	IQB90-Flu, Flu, SF (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nuestros colaboradores de la UFRGS	Inyección rápida de etanol (incorporando el antígeno).	TSIV producida por Butantan. 7,5, 0,75 y 0,075 µg/ds de HA total.	s/c o i/n	BALB/c, hembras, 6-8 semanas de edad, n=9-11	Si. Virus de influenza tipo A cepa (H1N1) A/Brazil/G3P1/2013 (1 x 10 ³ UFP).	Priming: d0; booster: d14 Desafío: d28, y evaluación hasta d42 Fin del ensayo: d42 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Ensayo de protección frente al desafío letal con influenza	IMXQB90, IMXQB80, IMXQuilA®, QB90, QB80, Flu, IMXQB90 sin Flu, SF. (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nosotros en nuestro laboratorio	Diálisis (el antígeno se incorpora por mezcla simple previo a la inoculación)	Vaxigrip®, 7,5 µg/ds de HA total.	s/c o i/n	BALB/c, hembras, 6-8 semanas de edad, n=10	Si. Virus de influenza tipo A cepa (H1N1) A/Uruguay/897/2018 pdm09-like virus (1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ en 50 µL).	Priming: d0; booster: d14 Desafío: d28, y evaluación hasta d42 Fin del ensayo: d42 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Ensayo de protección frente al desafío letal con influenza en ratones de distinto sexo	IMXQB80, Flu, SF (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nosotros en nuestro laboratorio	Diálisis (el antígeno se incorpora por mezcla simple previo a la inoculación)	Vaxigrip®, 7,5 µg/ds de HA total.	s/c	CD1 hembras y machos, 6-8 semanas de edad, n=15	Si. Virus de influenza tipo A cepa (H1N1) A/Uruguay/897/2018 pdm09-like virus (1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ en 50 µL).	Priming: d0; booster: d14 Desafío: d28, y evaluación hasta d42 Fin del ensayo: d42 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Ensayo de protección frente al desafío letal con influenza en ratones envejecidos en distintas cepas	IMXQB80, Flu, SF (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nosotros en nuestro laboratorio	Diálisis (el antígeno se incorpora por mezcla simple previo a la inoculación)	Vaxigrip®, 7,5 µg/ds de HA total.	s/c	C57Bl/6 y BALB/c hembras, 6-8 semanas de edad, n=10	Si. Virus de influenza tipo A cepa (H1N1) A/Uruguay/897/2018 pdm09-like virus (1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ en 50 µL).	Priming: d0; booster: d14 Desafío: d28, y evaluación hasta d42 Fin del ensayo: d42 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Ensayo para evaluación del rol de Caspasa1/11 en la respuesta adaptativa desencadenada por SBAs de <i>Q. brasiliensis</i>	IQB90-Flu, Flu, SF (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nuestros colaboradores de la UFRGS	Inyección rápida de etanol (incorporando el antígeno).	TSIV producida por Butantan. 7,5 µg/ds de HA total.	s/c	C57Bl/6 <i>ko</i> para el gen de caspasa 1/11 y sus littermates <i>wt</i> , de 12 semanas de edad, n = 5	No	Priming: d0; booster: d14 Desafío: no aplica Fin del ensayo: d28 Tomas de sangre: d0, d14 y d28.
Evaluación de la inmunidad frente a influenza a largo plazo (60 días)	IMXQB90, IMXQB80, IMXQuilA®, QB90, QuilA® Flu, SF. (5 µg de saponinas/ds)	Producidas por nosotros en nuestro laboratorio	Diálisis (el antígeno se incorpora por mezcla simple previo a la inoculación)	Vaxigrip®, 7,5 µg/ds de HA total.	s/c	BALB/c, hembras, 6-8 semanas de edad, n=4-5	No	Priming: d0; booster: d14 Desafío: no aplica Fin del ensayo: d60 Tomas de sangre: d0, d14, d28, d42, y d60.

3.10.5. Determinación de la carga viral en pulmón

Al día 5 post desafío, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se obtuvieron los pulmones de manera aséptica. Los mismos se mantuvieron a -80 °C hasta la determinación del título viral. Para ello, los pulmones fueron disgregados utilizando un disruptor de tejidos en condiciones de esterilidad, y centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los pulmones se titularon de acuerdo al método de Reed & Muench²⁷⁹ y protocolos estándar transferidos gentilmente por la Dra. Mariana Baz de la Universidad de Laval, Canadá. Brevemente, 20 µL del sobrenadante de los pulmones fueron sembrados por cuatriplicado en placas de 96 wells conteniendo células MDCK (2×10^4 células/well) y 180 µL de medio DMEM en presencia de TPCK (1 µg/mL). A partir del well con la muestra sin diluir se realizaron 10 diluciones seriadas 1/10. A las 96 horas se observa el CPE y se calcula el título de la dosis infectante 50 TCID₅₀/mL como la potencia de la dilución en la que se observa el 50 % de los wells con CPE y se hace la multiplicación correspondiente para expresarlo por mL.

3.10.6. Evaluación de la respuesta humoral

3.10.6.1. *Determinación niveles de anticuerpos mediante ELISA*

La respuesta humoral desencadenada por las distintas formulaciones se evaluó en suero murino mediante un test de ELISA indirecto convencional. Se evaluó el título de anticuerpos específicos anti FhLAP IgM, IgGtotal (IgGt), IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3. Brevemente, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 wells (código 655061, Greiner Bio-One, Germany) durante toda la noche (ON) a 4 °C con el antígeno FhLAP (1,0 µg/mL) o Flu (0,5 µg/mL) descriptos previamente diluidos en buffer PBS (pH 7,2). Las placas se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 0,05% Tween® 20 (código P1379, Sigma, USA) (PBST) y se bloquearon con 1% seroalbúmina bovina (BSA, código A9647, Sigma, USA) en PBST durante 2 horas a 37 °C. Luego de lavar 3 veces como se explicó previamente, se agregaron los sueros por duplicado en diluciones apropiadas (100 µL/well) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se lavó nuevamente 3 veces, y se agregó la solución de anticuerpos que corresponda: *Goat anti-mouse* conjugado a la enzima peroxidasa (HRP) IgGtotal (Southern Biotech cat nº 1030-05), IgG1 (Southern Biotech cat nº 1071-05), IgG2a (Southern Biotech cat nº 1081-05), IgG2b (Southern Biotech cat nº 1091-05), IgG2c (Southern Biotech cat nº 1078-05), o IgG3 (Southern Biotech cat nº 1101-05), diluidos 1/10.000 en PBST. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de 3 lavados, las placas se revelaron con 100 µL/well de orto-fenilendiamina (OPD; código P5412 Sigma, USA) con 0,003% H₂O₂ o 100 µg/mL de 3,3',5,5', tetrametilbencidina (TMB, código T2885, Sigma, USA) en buffer acetato pH 5.5 con 0,003% H₂O₂ durante 30 minutos para FhLAP o 10 minutos para Flu a temperatura ambiente en cámara oscura. La reacción se detuvo con 30 µL/well de HCl 1N o H₂SO₄ 1N respectivamente. Se midió la densidad óptica (OD) a 490 o 450 nm respectivamente en un espectrofotómetro de placas (Sunrise, Tecan o Dynex Technologies). Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante una curva estándar realizada con sueros positivos, y se expresan en unidades arbitrarias por mL (AU/mL).

3.10.6.2. *Frecuencia de células B secretoras de anticuerpos específicos mediante ELISpot*

Se evaluó la frecuencia de células B productoras de anticuerpos antígeno-específicos producidas los animales inoculados con vacunas contra influenza, mediante un ensayo de ELISpot²⁸⁰,

adaptado de Lv y colaboradores²⁸¹ y puesto a punto para el sistema de estudio. Brevemente, se sensibilizaron placas Millipore (código MAGVN2250) con 2,5 µg/mL de antígeno Flu (Vaxigrip® o Instituto Butantan), durante 2 horas a 37°C. Se lavaron con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (código D5652, Sigma) estéril y filtrado, y se bloquearon con 1% BSA (código A9647, Sigma, USA) en PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ estéril y filtrado ON a 4 °C. Se lavaron y se sembraron los esplenocitos de ratón obtenidos tiempo final (1-2 x 10⁶, 1-2 x 10⁵ y 1-2 x 10⁴ células/well) por triplicado. Se incubaron ON a 37 °C y 5% CO₂. Se lavaron con PBST, y se colocaron anticuerpos α-IgG_{Total} (Southern Biotech código 1030-05), α-IgG1 (Southern Biotech código 1071-05), α-IgG2a (Southern Biotech código 1081-05), α-IgG2b (Southern Biotech código 1091-05), o α-IgG2c (Southern Biotech código 1078-05) todos conjugados a la enzima peroxidasa HRP. Se incubaron 1 hora a 37 °C. Luego de lavados con PBST, PBS y agua destilada, se procedió al revelado con 0,33 mg/mL de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, código A5754, Sigma Aldrich) en buffer acetato de sodio y 0,1 % H₂O₂ 10 vol, de acuerdo a lo descrito previamente²⁸². Se dejaron secar durante 3 días a temperatura ambiente, y se procedió al conteo de spots. El conteo se realizó dos veces por separado, y en orden aleatorio de las placas a fin de evitar sesgos. En caso de encontrar incongruencias, se procedió a un tercer conteo. Todos los wells fueron fotografiados, a fin de mantener su registro. Cada spot corresponde a una célula secretora de anticuerpos (ASC). El resultado se expresa como número de ASC en el total de células sembradas en el well.

3.10.6.3. Determinación de títulos HAI

La determinación de los títulos de inhibición de la aglutinación de los anticuerpos séricos fue gentilmente realizada por los Dres. Fernando Silveira y Samuel Cibulski en el Depto. de Virología del Instituto de Ciencias de la Salud de la UFRGS, Porto Alegre, Brasil, según lo descrito por nosotros recientemente²⁸³. Brevemente, distintas diluciones de los sueros (diluciones seriadas al medio, desde 1/20 a 1/2048) de los animales inmunizados fueron tratados con una solución de la enzima RDE (Enzima Destructora de Receptor de *Vibrio cholerae*, Sigma-Aldrich, USA) y luego mezclados con el antígeno Flu (TSIV producida por el Instituto Butantan) en la misma concentración para todas las diluciones de suero. Se agregaron glóbulos rojos de pavo, y se evaluó la formación de hemaglutinación. El título de inhibición de la aglutinación se definió como el recíproco de la dilución de anticuerpos en la que se deja de observar la aglutinación.

3.10.7. Evaluación de la respuesta celular

3.10.7.1. Ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH)

Se evaluó la respuesta celular inducida por las formulaciones mediante un ensayo de hipersensibilidad retardada *in vivo*. A tiempo final del ensayo, o 48 horas antes del mismo, se inoculó a los animales con 10 µL de una solución conteniendo 10 % del antígeno inoculado en cada dosis de los ensayos de vacunación, por vía intradérmica (ID) en la almohadilla de la pata trasera derecha, utilizando una jeringa Hamilton®. Previo a la inoculación, y 24 y 48 horas después se midió el grosor de la pata con un calibre electrónico. La inflamación inducida en el grupo inoculado con buffer o solución salina, fue considerada como inflamación basal. La respuesta de cada animal fue calculada como la medida de la pata inyectada menos el promedio de la medida del grupo control.

3.10.7.2. Linfoproliferación

Los esplenocitos obtenidos a tiempo final se tiñeron con 5 μ M de carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, código 21888, Sigma, USA) *ex vivo* según protocolos estándar de nuestro laboratorio. Brevemente, los esplenocitos se estimularon durante 3-4 días con el antígeno de interés (5 μ g/mL), con 1 μ g/mL del mitógeno concanavalina A (ConA, código C5275, Sigma, USA) como control positivo, o sin estimular (SE) como control negativo. Luego se realizó una tinción de superficie con anticuerpos de citometría conjugados a fluoróforos: anti-mouse CD8-PE/Cy7 (código 100722, Biolegend) y anti-mouse CD4-APC/Cy7 (código 100414, Biolegend), para evidenciar poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Combinando la fluorescencia de éstos con el decaimiento de la fluorescencia de CFSE, que permite evidenciar cómo se suceden las generaciones celulares, se evidencia la proliferación de éstos. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD). Para determinar el índice de proliferación (PI) de cada subpoblación de linfocitos se utilizó el programa ModFit LT™ versión 5.0.9, Verity Software House. El IP de cada muestra se expresa como el IP de los linfocitos estimulados con ConA o el antígeno en relación al IP de los linfocitos sin estimular (ConA/SE o Ag/SE).

3.10.7.3. Producción de citoquinas

Se evaluó el perfil de citoquinas secretadas en el sobrenadante de esplenocitos estimulados provenientes de ratones inmunizados, o en el sobrenadante de BMDCs o macrófagos previamente estimulados, mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron kits comerciales con *beads* para detección de múltiples citoquinas en simultáneo. Los kits utilizados fueron el Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 (anti-mouse, código 560485, BD), que permite la cuantificación de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, y el LegendPlex™ (mouse inflammation panel, 13-plex, código 740446, Biolegend), que permite la detección en simultáneo de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, CCL2 (MCP-1), IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. Para la realización de los ensayos se siguieron las recomendaciones de los fabricantes. Los datos fueron procesados utilizando el software indicado en cada kit comercial.

3.11. Análisis estadístico

Para el análisis de datos paramétricos se utilizó el t-test para comparar entre 2 grupos, o el test One-way ANOVA y el post test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar todos los grupos contra el grupo control. Para realizar comparaciones entre dos grupos con datos no paramétricos se utilizó el test de Mann-Whitney (t-test no paramétrico). Para el análisis de datos no paramétricos se utilizó el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) y el post-test de Dunn con corrección para comparar varios grupos contra un grupo control. Para analizar y graficar los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.4.2 (679) GraphPad Software, LCC. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. En las representaciones gráficas se muestra la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) de cada grupo, y los valores individuales a menos que se indique lo contrario.

4. Resultados y discusión

4.1. Capítulo 1: Obtención de fracciones de saponinas, EEP y nanoformulaciones

4.1.1. Obtención de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*

En este trabajo se utilizaron fracciones de saponinas obtenidas de extractos foliares de *Q. brasiliensis* denominadas Fb, QB90 y QB80. Las diferentes fracciones fueron obtenidas mediante el método descrito por Yendo y colaboradores²⁶⁶, según se describe en Materiales & Métodos (sección 3.1.1). En los inicios de esta tesis, se trabajó con fracciones cedidas gentilmente por otros investigadores, con amplia experiencia en la producción de estos compuestos. En la medida en que la línea de investigación fue avanzando, y debido a la escasa cantidad con la contábamos de cada lote de cada fracción, las fracciones se comenzaron a producir en nuestro laboratorio en cantidad suficiente para poder hacer experimentos para la caracterización general, y también para el estudio de la inmunidad innata y adaptativa. En este sentido, a partir de las hojas de *Q. brasiliensis* se logró obtener AE y a partir de éste se obtuvieron las fracciones QB80 y QB90 mediante la extracción en columna de sílica según el método de Yendo y colaboradores²⁶⁶. En la Tabla 5 se detalla la fuente de cada fracción utilizada en este trabajo, y en qué ensayos (que se describirán más adelante) se utilizó cada fracción.

Tabla 5. Fuente de obtención de las distintas fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* y ensayos en que se utilizaron.

Fracción	Producida por	Utilizada en
Fb	Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, Facultad de Química, Udelar, cedida gentilmente por el Dr. Fernando Ferreira.	Ensayo de vacunación con <i>FhLAP</i> (secciones 4.3.1.1 y 4.3.1.2).
QB80Br	Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Biotecnología e Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil, cedida gentilmente por Dr. Arthur Fett-Neto y Dra. Anna C. Yendo.	Ensayo de vacunación y desafío con <i>FhLAP</i> (sección 4.3.1.3).
QB90Br	Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Biotecnología e Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil, cedida gentilmente por Dr. Arthur Fett-Neto y Dra. Anna C. Yendo.	Ensayos <i>in vitro</i> para el estudio de la interacción con MyD88 (sección 4.2.3) y producción de IL-1 β por parte de BMDCs (sección 4.2.4). Ensayos de vacunación y desafío contra influenza utilizando como antígeno la vacuna contra influenza estacional producida por el Instituto Butantan (secciones 4.3.2.2; 4.3.2.3 y 4.3.2.5).
QB80Uy	Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar, producidas por Fernando Silveira, Soledad Sienra y Mariana Rivera Patron.	Ensayos para la evaluación de la respuesta innata (secciones 4.2.1; 4.2.2 y 4.2.3); ensayos de vacunación y/o desafío contra influenza utilizando como antígeno la vacuna Vaxigrip® (secciones 4.3.2.1 y 4.3.2.4).
QB90Uy	Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar, producidas por Fernando Silveira, Soledad Sienra y Mariana Rivera Patron.	Ensayos para la evaluación de la respuesta innata (secciones 4.2.1; 4.2.2 y 4.2.3); ensayos de vacunación y/o desafío contra influenza utilizando como antígeno la vacuna Vaxigrip® (secciones 4.3.2.1; 4.3.2.4 y 4.3.2.6).

4.1.2. Caracterización de las fracciones de saponinas

La caracterización fisicoquímica fue realizada mediante MALDI-TOF-MS según se detalla en Materiales & Métodos. A pesar de las diferencias encontradas en los patrones de picos de escisión, las fracciones de saponinas nativas QB80 y QB90 producidas en Brasil (QB80Br y QB90Br, Fig. 18A y B respectivamente), o en nuestro laboratorio en Uruguay (QB90Uy Fig.18C) presentan picos de escisión en la región 1850-2200 m/z que denotan la presencia de fracciones de saponinas producidas por árboles del género *Quillaja*, al igual que el patrón de picos de escisión de la mezcla de saponinas comerciales QuilA® (Fig. 18D).

En particular, QB80Br presentó un patrón de escisión en las regiones espectrales de 750-1000 m/z y 1850-2200 m/z, donde se encuentran los picos de escisión característicos de las saponinas de *Quillaja sp.*, similar al patrón de QuilA®. Los picos observados en la región de 700-1000 m/z corresponden a los picos base de las saponinas, formados por el clivaje de los sustituyentes de agliconas²⁸⁴. Además, en la región entre 1850-2200 m/z se encontró un patrón de picos que se correlaciona con diferentes motivos trisacáridicos unidos a la aglicona ácido quillaico, así como también una cadena acil unida a un residuo de fucosa en saponinas de *Q. saponaria*^{98,99}. Conjuntamente con los picos 1898 y 2029 m/z que están presentes en los dos compuestos, se observan picos menores entre cada espectro, lo que permite inferir que las saponinas son similares. Asimismo, los espectros de los dos compuestos contienen productos en altos valores m/z, separados por 18, 42, 90 y 94 unidades, un patrón característico y específico de las saponinas de *Quillaja*²⁸⁴. A pesar de que este patrón no se observó para la fracción QB90, es importante destacar que la técnica de MALDI-TOF-MS no es ampliamente utilizada para la caracterización de saponinas. Aunque hay algunos reportes sobre el uso de MALDI-TOF-MS para la caracterización de fracciones de saponinas de *Q. saponaria*^{98,99,285}, los resultados obtenidos por nuestro grupo fueron los primeros publicados sobre el patrón espectral de saponinas de *Q. brasiliensis* utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF-MS¹³⁰ y permiten inferir la presencia de saponinas en las dos especies de *Quillaja*¹²⁵. Aunque la técnica de MALDI-TOF-MS contribuye a una caracterización preliminar de los componentes bioactivos de las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*, la estructura completa de estos metabolitos escapa a los cometidos de esta Tesis, y debe estudiarse mediante otros métodos, tales como espectroscopía de masa (ESI-MS) o resonancia magnética nuclear (NMR). La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta rápida y costo-efectiva que, aunque debe ser explorada con más profundidad, podría contribuir al desarrollo de protocolos estandarizados y reproducibles para la extracción, purificación y caracterización de las saponinas de *Q. brasiliensis*.

En particular para esta tesis, los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF-MS son muy auspiciosos, ya que indican que las fracciones de trabajo contienen saponinas, de forma similar a QuilA®. Reportes previos sobre la caracterización química de QB90 revelaron que contiene componentes similares a QuilA®, tales como la prosapogenina triterpénica 3-O-β-D-glucuronopiranosil-ácido quillaico^{98,286}. Además, reportes recientes sobre los distintos compuestos presentes en el AE de *Q. brasiliensis*, a partir del que se obtienen las fracciones de interés en esta tesis, revelaron la presencia de la saponina QS-21²⁸⁷. Esta saponina es extraída de *Q. saponaria*, comercializada y utilizada como adyuvante en vacunas licenciadas para humanos²⁸⁸ contra malaria¹¹⁰, herpes zóster²⁸⁹ o SARS-CoV-2²⁹⁰.

Respecto a las características de las saponinas presentes en Fb, Wallace y colaboradores han reportado recientemente la elucidación estructural de algunas saponinas presentes en esta fracción, utilizando una combinación de espectroscopía de masa (ESI-MS) y resonancia

magnética nuclear (NMR). En este sentido, han reportado que Fb contiene al menos dos saponinas triterpénicas, ambas aisladas previamente de la corteza de *Q. saponaria*. En primer lugar, identificaron una saponina comparable a S13, una saponina aislada por Nord & Kenne⁹⁹, pero que en este caso la aglicona corresponde a un motivo de ácido 23-O-acetilfitolaccínico. En segundo lugar, identificaron a Qb1, un isómero de QS-21, que ha demostrado poseer tres características fundamentales que han sido identificadas como relevantes para la capacidad adyuvante de QS-21: un grupo aldehído en la posición C23, un grupo hidroxilo en la posición C16 del ácido quillaico, y una cadena lateral de ácido graso que se extiende desde O4 del residuo fucosil^{115,291}.

En cuanto a los grupos que serían determinantes en la capacidad adyuvante de las saponinas, Fernandez-Tejada y colaboradores demostraron que el grupo alcohol en C16 es crucial y que el grupo acyl en C4 no es tan fundamental como inicialmente se creía, ambos para el caso de QS-21^{118,292,293}. Como se mencionó previamente, la presencia del primer grupo fue identificada por Wallace y colaboradores en la Fb de *Q. brasiliensis*¹¹⁵.

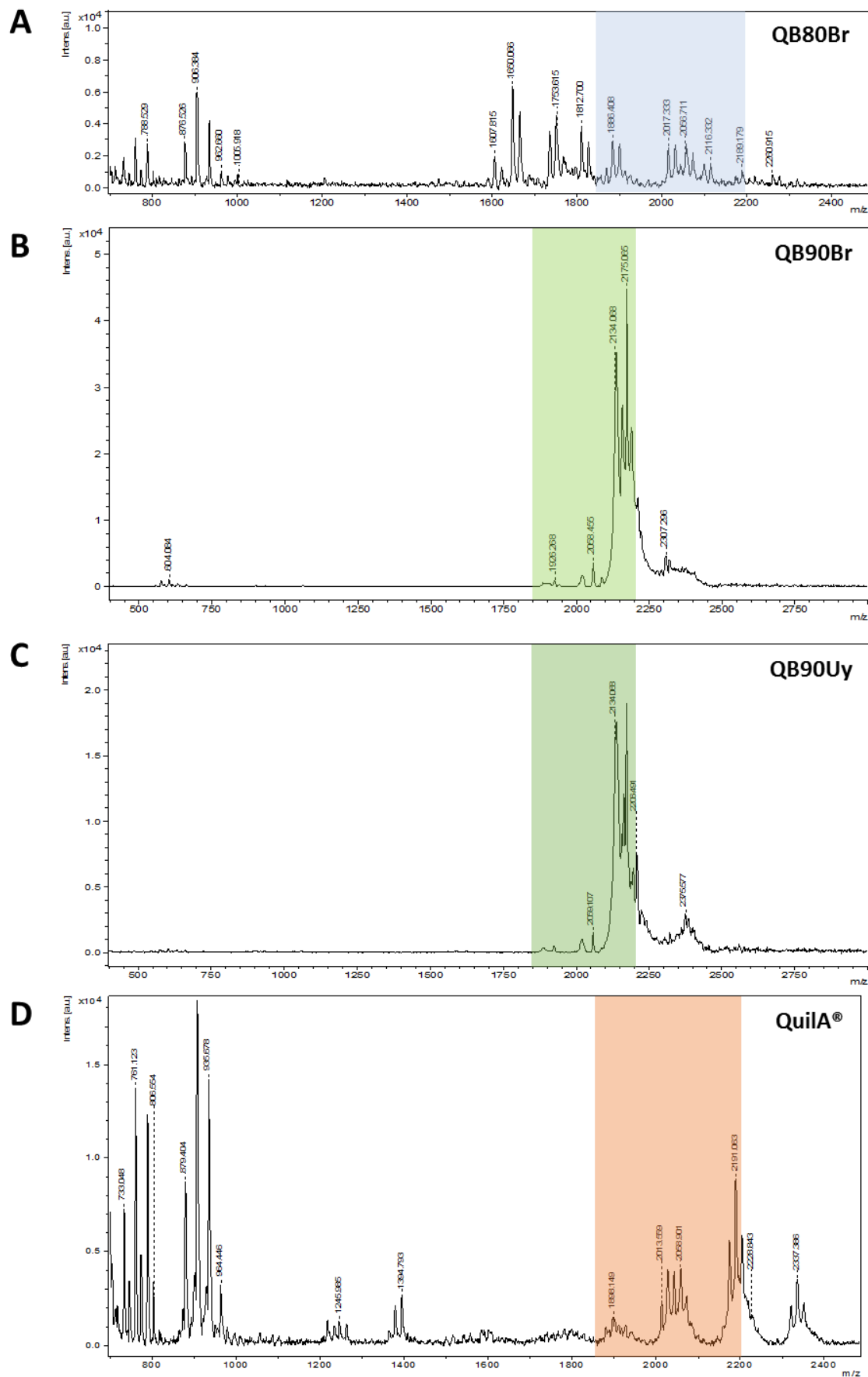


Figura 18. Caracterización de las fracciones QB80 y QB90 mediante MALDI-TOF. Los espectros de masa obtenidos mediante MALDI-TOF de las fracciones de *Q. brasiliensis* QB80Br (A), QB90Br (B), QB90Uy (C) y de la fracción comercial

QuilA® (D). Se resalta en color la región entre 1850 y 2200 m/z, donde se ubican los picos de escisión característicos de las saponinas. Los productos se detectaron como iones $[M + Na]^+$ y/o $[M + K]^+$. A y D fueron adaptadas de Cibulski, Rivera-Patron, et.al. 2018¹³⁰.

4.1.3. Obtención y caracterización fisicoquímica de extractos etanólicos de propóleos (EEP)

De propóleos obtenidos por el método de raspado de colmenas de productores apícolas del Departamento de Soriano, se logró exitosamente la preparación de EEP, según se explicó en Materiales & Métodos. A partir de 2 g de propóleos se obtuvieron 25 mL de EEP filtrados con una concentración de 40 g/L en alcohol 75 % o absoluto.

La caracterización de los EEP obtenidos se realizó mediante la determinación de polifenoles y flavonoides por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados indican que los propóleos de trabajo tienen un contenido de polifenoles de 87 ± 8 GAE/g de propóleos, y 19 ± 1 mg de flavonoides por gramo de propóleos (media $\pm$ desviación estándar, $n=3$ en ambos casos).

Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio previo con propóleos uruguayos¹⁸¹, donde la muestra analizada presentaba características organolépticas coincidentes con los propóleos utilizados en este trabajo. Aunque la caracterización exhaustiva escapa a los cometidos de este trabajo, en el futuro sería interesante determinar los compuestos orgánicos presentes en este extracto, que luego serán los que tendrán capacidad inmunoestimulante, con el fin de preparar sistemas de adyuvantes que contengan únicamente las moléculas necesarias, evitando variaciones entre lotes debido a moléculas accesorias, y asegurando la reproducibilidad de las formulaciones. A la vez, se logran formulaciones que no contengan componentes accesorios o impurezas que no mejoren la inmunogenicidad y puedan, sin embargo, ocasionar efectos adversos.

4.1.4. Nanoformulaciones: visualización por MET y DLS

Se logró exitosamente la formulación de NPs tipo ISCOM o IMX utilizando saponinas comerciales (Quil A®) o saponinas de *Q. brasiliensis* (Fb, QB90Br, QB90Uy, QB80Br, y QB80Uy) mediante el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹, o mediante el método de diálisis^{267,268}. Además, se logró exitosamente la formulación de NPs tipo ISCOM o matrices conteniendo EEP (ISCOMPro o IMXPro). Las NPs se visualizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), o MET de Alta Resolución (HR-MET) mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo, y se corroboró el tamaño esperado de aproximadamente 40 nm y la morfología “tipo caja” (Figura 19). En particular, se muestran las micrografías de ISCOMs con Fb conteniendo antígeno parasitario *FhLAP* (Fig. 19A), ISCOMs con QB90Br con antígeno viral de influenza (Fig. 19B), y también la formulación de IMX con QuilA® (Fig. 19C), formuladas mediante el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹. También se muestran las micrografías de IMXs producidas mediante el método de diálisis²⁶⁷ con esta misma saponina comercial (Fig. 19D), con QB90Uy (Fig. 19E) o con QB80Uy (Fig. 19F). Además, se muestran las micrografías de IMX con EEP y QuilA® (Fig. 19G) o QB90 (Fig. 19H) por el método de inyección rápida de etanol¹⁷⁹, sin antígeno (IMXPro). También se logró exitosamente la formulación de ISCOMPro con antígeno OVA o *FhLAP* (datos no mostrados). La utilización de IMX es más ventajosa que los ISCOMs ya que, una vez que se logra la formulación, la misma puede ser combinada con diferentes antígenos vacunales por simple mezcla entre componentes previo a la administración, generando el mismo efecto adyuvante que generan los ISCOMs (en los que se debe incorporar el antígeno al momento de formular las NPs)¹⁴¹. Esto hace que las formulaciones IMX tengan mayor versatilidad, y permite optimizar tiempos de formulación de estos adyuvantes, a la vez que permite

estandarizar la producción de los mismos. Los estudios por MET han permitido caracterizar y dilucidar la estructura de los ISCOMs, y aunque continúa siendo la mejor herramienta para ello, presenta algunas desventajas que es necesario considerar. Por ejemplo, las formulaciones de estudio pueden tener afinidad variable a las grillas de MET, y la estructura puede sufrir variaciones durante la preparación y tinción de la muestra. Por lo tanto, la estructura de las NPs en suspensión puede no ser la misma que la estructura visualizada por MET¹⁴⁵. Por esta razón, aunque en todos los casos se visualizaron nanopartículas con características de ISCOMs o IMX, de forma de tipo caja y del tamaño esperado de aproximadamente 40 nm mediante MET o HR-MET, se realizó la técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS) para corroborar la homogeneidad de las formulaciones, utilizando un zSizer (Malvern Instruments). Esta técnica también ha sido ampliamente utilizada para caracterizar NPs tipo ISCOMs, en general para conocer la distribución del tamaño de partículas. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de estructuras que suelen ocurrir como sub-productos en las nanoformulaciones tipo ISCOMs (micelas helicoidales como por ejemplo en la Fig. 19D), los datos de DLS se deben interpretar con cierta cautela¹⁴⁵. Aunque algunas de las nanoformulaciones mostraron tener partículas de varios tamaños, en todas las preparaciones formuladas por ambos métodos (inyección rápida de etanol y diálisis), ya sea conteniendo QuilA® o saponinas de extractos foliares de *Q. brasiliensis* (producidas en nuestro laboratorio o en Brasil, QB90 o QB80), las nanopartículas de aproximadamente 40 nm eran la población mayoritaria (100% del número de partículas, Tabla 6). Las NPs conteniendo EEP (ISCOMPro e IMXPro) y saponinas comerciales o nativas presentaban mayor tamaño (135 a 235 nm). Dado que por HR-MET se visualizaron las NPs con EEP de aproximadamente 40 nm, este mayor tamaño observado en el DLS podría deberse a que componentes presentes en el EEP interaccionan creando acúmulos de partículas, que luego se visualizan en el DLS como partículas más grandes. Estas formulaciones podrían optimizarse por ultracentrifugado de las formulaciones en colchón de sacarosa al 20 %, de manera de separar las nanopartículas de aproximadamente 40 nm de otros componentes.

El tamaño de las NPs es un factor determinante de la capacidad adyuvante, ya que impacta directamente en la eficacia, la magnitud y el tipo de respuesta inmune que podrán desencadenar. Las partículas con tamaño mayor a 1 μm (similar al tamaño de una bacteria) son internalizadas vía fagocitosis, mientras que las partículas menores a 1 μm son internalizadas por micropinocitosis, endocitosis mediada por receptores de clatrina, y por endocitosis independiente de clatrina y caveolina. A su vez, la forma de ingreso de las nanopartículas a las células, va a determinar la captación y el procesamiento antigénico, y la subsiguiente activación de las células T, B, y otros mediadores del sistema inmune²⁹⁴. Además de ser internalizadas por DCs en el sitio de inoculación y ser transportadas hacia los dLN por éstas, las NPs menores a 200 nm logran difundir hacia el dLN, sin necesidad de ser transportadas por células, facilitando así la internalización y presentación antigénica por las DCs foliculares (fDCs). En este sentido, se ha reportado ampliamente que las NPs más pequeñas son internalizadas por las DCs y se acumulan en los dLN con más eficiencia que las de mayor tamaño, promoviendo una respuesta inmune más potente. No obstante, aún dentro de las NPs menores a 100 nm, hay diferencias en cuanto al procesamiento y la respuesta inmune desencadenada según tamaños. Por ejemplo, Chithrani y colaboradores estudiaron la internalización de NPs de oro (AuNPs) de tamaños entre 14 y 100 nm por parte de células epiteliales (HeLa), y encontraron que el tamaño óptimo de AuNPs para la internalización era de 50 nm²⁹⁵. No obstante, otros estudios con AuNPs en modelo murino demostraron que las partículas de 50-100 nm son opsonizadas por componentes del complemento (CR2 y C3) en mayor medida que las mismas partículas de menor tamaño (5-15 nm), lo que deriva en un aumento de la retención de las AuNPs, también un aumento de la

presentación de antígeno por parte de las dendritas de las fDCs, y reacciones del centro germinal más robustas. Se determinó entonces que, para el caso de las AuNPs, la fisiología del dLN determina la cinética y la interacción celular con las NPs. Aunque todas las NPs menores a 100 nm pueden llegar al dLN a través de la linfa, su destino dentro del dLN va a estar determinado por el tamaño. La unión de las NPs a las dendritas de las fDCs fue mayor en las AuNPs de 50-100 nm debido a que éstas adsorben en mayor medida al componente C3 del complemento. Sin embargo, esto sólo ha sido demostrado para partículas de oro. Si esto también sucede para NPs de otra naturaleza, o con otros antígenos, y por ende cómo es el mecanismo de activación de la respuesta inmune, aún debe ser dilucidado²⁹⁶. En el caso de NPs auto-emulsificantes de escualeno y surfactantes, combinadas con antígenos de influenza, se evidenció que las NPs de 160 nm son mejores adyuvantes que las de menor tamaño (90 y 20 nm), en el sentido que son capaces de promover un mayor reclutamiento de células del sistema inmune innato en el sitio de inoculación, y una mayor eficiencia en la traslocación de células cargadas con el antígeno de interés al dLN, derivando en una respuesta inmune humoral más potente²⁹⁷.

Los adyuvantes nanoparticulados presentan una diferencia fundamental con las nanoformulaciones utilizadas para entrega de moléculas (drogas) terapéuticas con blancos celulares o moleculares definidos, y en general acotados. En estos casos se considera que las partículas más pequeñas son mejores por su habilidad de permear a través de distintas barreras biológicas. No obstante, en el caso de nanoformulaciones vacunales, esta “ventaja” no es tal, ya que la eficiencia de una vacuna se basa en el reconocimiento específico de la misma por parte de las células del sistema inmune, y en la activación de estas células para posterior generación de la respuesta correspondiente²⁹⁷. Fife y colaboradores estudiaron la capacidad adyuvante de micro- y nanopartículas sólidas de poliestireno carboxilado de diferentes tamaños con antígeno (OVA) conjugado covalentemente. Las NPs de 40-50 nm fueron las que desencadenaron la respuesta inmune más potente, tanto a nivel humoral como por la generación de respuestas T citotóxicas, que las NPs de la misma composición y diferente tamaño (mayores a 500 nm). Además, demostraron que estas NPs eran capaces de eliminar eficientemente tumores de la línea EG7-OVA ya establecidos en modelo murino^{298,299}.

En el caso de las NPs tipo ISCOMs o IMX (de forma tipo caja y 40 nm de tamaño) se ha reportado que rápidamente, en 2 horas post-inoculación, se transportan por difusión hacia el dLN, donde son internalizados por las DCs y otras APCs allí residentes. Además, las DCs y otras APCs periféricas, residentes del tejido del sitio de inoculación, van a transportar a los IMX hacia el dLN a las 24-48 horas post-inoculación^{137,300}. Se ha detectado que la presentación antigénica en dLN comienza a partir de las 12 horas post inoculación, y persiste durante 5 o 6 días luego de la inoculación. Además, las células que directamente encuentran/internalizan IMX (ya sea en el dLN o en el sitio de inoculación) sufren estrés metabólico, lo que desencadena múltiples cascadas de señalización de “peligro” e induce la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias¹³⁷. Debido a estas dos “oleadas” de transporte y presentación de antígeno, a que el proceso ocurre en dos localizaciones simultáneamente (dLN y sitio de inoculación) y a las propiedades inmunestimulantes de las saponinas que se encuentran en los IMX, ocurre una presentación antigénica prolongada y en un contexto proinflamatorio, lo que desencadena la potente respuesta mixta Th1/Th2 característica de las nanoformulaciones tipo ISCOM o IMX, que no ocurre con otros adyuvante nanoparticulados¹⁴¹.

Aunque ha sido ampliamente estudiado, aún no hay consenso en torno a cuál sería el tamaño óptimo de las NPs necesario para generar la respuesta inmune más adecuada o potente, ya que NPs de diferentes materiales mostraron distintos tamaños óptimos para la inducción de una

respuesta inmune robusta. Esto se debe a la amplia diversidad de NPs en cuanto a: (i) su composición (orgánicas: liposomas, ISCOMs, etc; inorgánicas: oro, carbón, silica, etc), (ii) forma (bastones, esferas, micelas helicoidales, etc), (iii) carga superficial (catiónicas, aniónicas), (iv) las distintas maneras de conjugar el antígeno (unión covalente, no covalente, puentes di-sulfuro, PEG-ilación, etc), (v) la diversidad de antígenos vacunales con que se estudian, y (vi) la respuesta inmune requerida frente a cada vacuna. Sin embargo, en el caso de las NPs tipo ISCOM o IMX se ha postulado que logran promover una respuesta tan eficiente, y la generación de respuesta de CTL, debido a su similitud (en tamaño y forma) a partículas virales. El sistema inmune de los mamíferos ha co-evolucionado con los patógenos que afectan a los organismos y, por ende, ha desarrollado estrategias para poder eliminarlos. Una fuerte respuesta celular con un fuerte componente de CTL es la respuesta necesaria para eliminar patógenos intracelulares (en general virus), mientras que una respuesta de carácter humoral polarizada hacia el fenotipo Th2, que es la generada por partículas de mayor tamaño similar a bacterias, en general es la necesaria para eliminar a este tipo de patógenos^{299,301}.

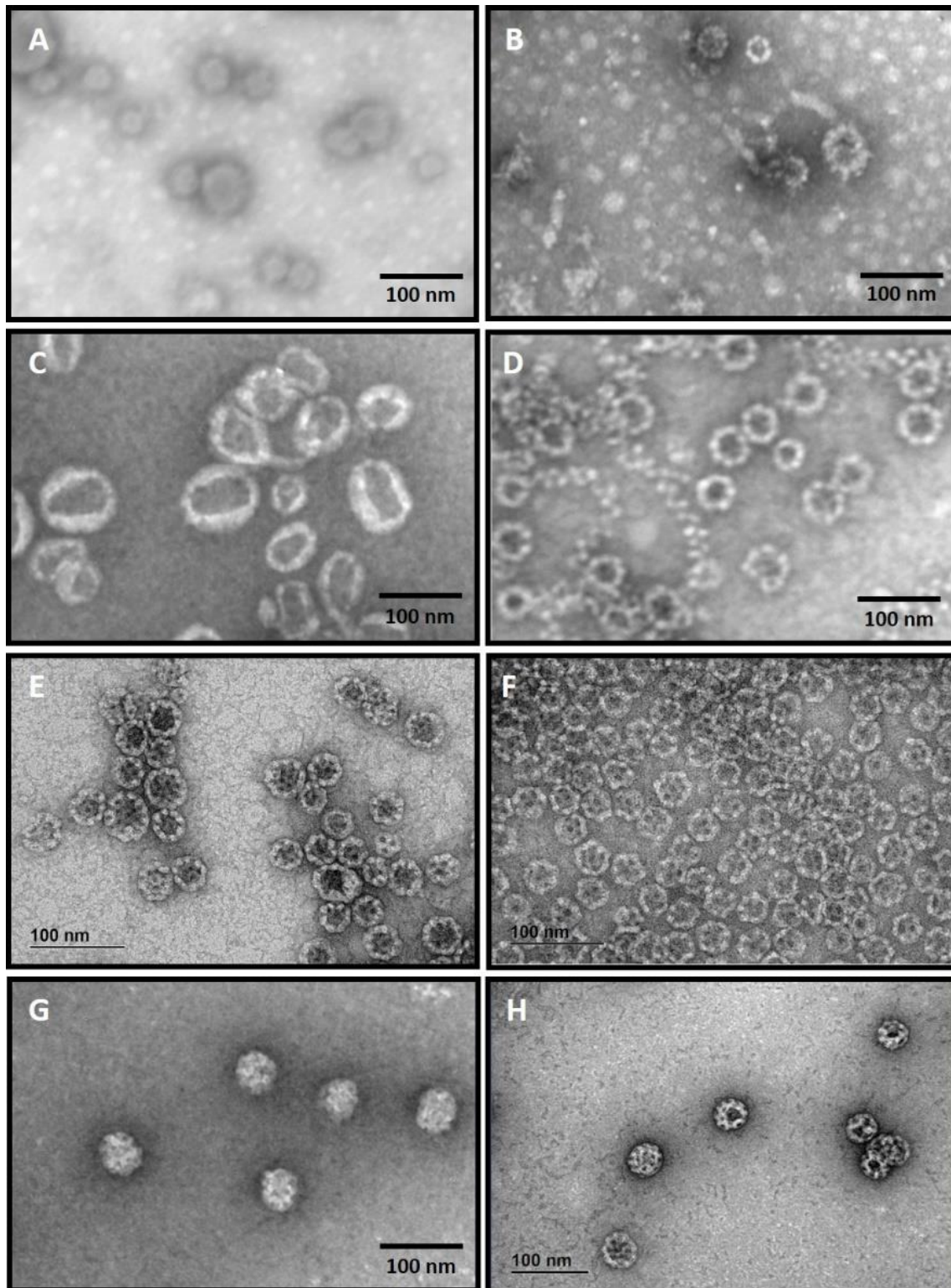


Figura 19. Visualización de nanopartículas tipo ISCOM o ISCOMATRIX mediante MET o HR-MET. Se muestra las micrografías de ISCOMs formulados con Fb y antígeno FhLAP (A), o QB90Br y antígeno de influenza (TIV, Buntantan) (B), o con la saponina comercial QuilA® sin antígeno (C), mediante el método de inyección rápida de etanol. Además, se muestran las nanoformulaciones producidas mediante el método de diálisis y sin antígeno (IMX) con la saponina comercial QuilA® (D), o con las saponinas nativas producidas en nuestro laboratorio QB90Uy (E), QB80Uy (F). También se muestran micrografías de las nanoformulaciones IMXPro formuladas mediante el método de inyección rápida de etanol con la saponina comercial QuilA® (G), o con la saponina nativa QB90Br (H). Las muestras sufrieron una tinción negativa con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2 % durante 2 minutos. Para las micrografías A-D & G se utilizó una grilla de FormVar Carbon Film On 200 mesh copper FCF-200-Cu 50/pk, en un microscopio electrónico de

transmisión JEM 1010 (Electronmicroscope JEOL, Japan), con un voltaje de aceleración de 80 kV, y una magnificación de 120.000 x (operado por Dra. Gabriela Casanova, UMET, FCien, Udelar). Para las micrografías E, F & H se utilizó una grilla de 300 mesh de cobre con film de carbón ultrafino y un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) JEOL JEM 2100, Japan, con un voltaje de aceleración de -200 kV, y las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD GATAN ORIOUS 1000 sin filtro (operado por Lic. Álvaro Olivera, Depto. Desarrollo Tecnológico, CURE, Udelar). En cada micrografía se indica una barra correspondiente al tamaño de 100 nm. En todos los casos se observan NPs tipo ISCOM o ISCOMATRIXTM de aproximadamente 40 nm.

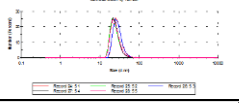
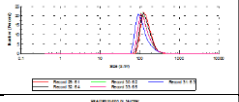
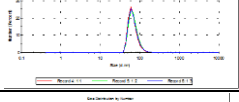
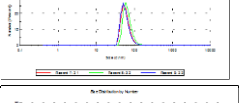
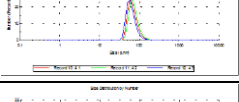
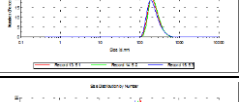
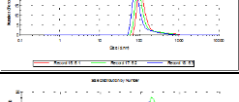
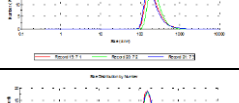
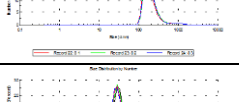
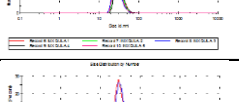
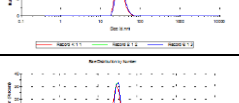
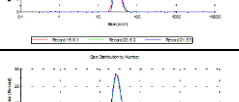
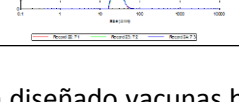
Otra característica que se estudió mediante DLS fue la movilidad electroforética de las partículas, y con ella se determinó el potencial Z de las nanoformulaciones. En todos los casos las NPs presentaron carga negativa y de bajo valor absoluto (-5 a -15 mV, Tabla 6). Aunque hay varios factores que afectan al potencial Z, tales como pH, fuerza iónica del medio y concentración de las NPs, una de las aplicaciones de determinar el potencial Z es brindar información acerca de la estabilidad de las dispersiones de NPs. En general se considera que las formulaciones con valores de potencial Z ± 0 -10 mV son altamente inestables, mientras que potencial Z de ± 10 -20 mV, ± 20 -30 mV y $\geq \pm 30$ mV son relativamente, moderadamente o altamente estables, respectivamente. No obstante, tales simplificaciones no siempre son acertadas, y la realidad es más compleja. Aunque el valor de potencial Z puede brindar aproximaciones, no tiene en cuenta todos los factores que efectivamente contribuyen a la estabilidad coloidal. La teoría DLVO (denominada así por sus inventores: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) establece que la estabilidad coloidal depende de la sumatoria de las fuerzas atractivas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas repulsivas debido a la doble capa eléctrica. El potencial Z brinda información sobre las interacciones electrostáticas repulsivas, pero no considera las fuerzas atractivas de Van der Waals. Por esta razón, hay formulaciones coloidales que a pesar de tener un valor bajo (en términos absolutos) de potencial Z, son formulaciones estables, y viceversa. En este sentido, es importante destacar que las fuerzas de Van der Waals dependen de la constante de Hamaker, que indirectamente corresponde a la diferencia entre el índice de refracción de la partícula y del dispersante. Por esta razón, si la constante de Hamaker es baja, las fuerzas atractivas de Van der Waals también son bajas, por lo que una baja repulsión electrostática (reflejada por valores de potencial Z entre ± 10 -15 mV) puede ser suficiente para asegurar la estabilidad coloidal. Además, las interacciones estéricas también contribuyen a la estabilidad coloidal. Por ejemplo, muchas nanoformulaciones oleosas (agua-en-aceite) son muy estables a pesar de tener bajo potencial Z³⁰². En este sentido, las NPs tipo ISCOMs o IMX podrían tener expuestas hacia la superficie cadenas laterales hidrofílicas de las moléculas de saponinas, en general los grupos R de carbohidratos, contribuyendo a un mayor efecto estérico, y favoreciendo de esta manera a la estabilidad coloidal. De todas maneras, sería interesante en el futuro poder determinar la estabilidad coloidal a lo largo del tiempo de las NPs tipo ISCOMs formuladas por diferentes métodos con las distintas saponinas nativas, con o sin EEP, y con o sin diferentes antígenos. En caso de que fuera necesario mejorar la estabilidad de las nanoformulaciones, se pueden aplicar métodos para ello. Uno de estos métodos es la PEGilación, es decir, la unión o fusión covalente o no de cadenas de polietilenglicol a las NPs, que contribuye a la estabilidad coloidal mientras que disminuye el potencial Z³⁰³. No obstante, en caso de PEGilar a las NPs tipo ISCOMs sería importante evaluar si ocurren cambios en la funcionalidad de éstas, que deriven en cambios de actividad en términos inmunológicos.

Aunque el potencial Z no mide la carga ni la densidad de carga intrínseca de las partículas permite evaluar la carga superficial de éstas. Por ello, en general solo se tiene en cuenta la magnitud de potencial Z, mientras que el signo positivo o negativo asociado no es un dato robusto, y no debe ser relacionado con la carga de la superficie ni la densidad de carga, ni es correcto hacer comparaciones entre distintas nanoformulaciones. Hay varios factores, tales

como el pH, que pueden cambiar el potencial Z de negativo a positivo o viceversa. El potencial Z solo indica la naturaleza de la carga de superficie (si es positiva o negativa), asumiendo que los iones predominantes en la doble capa eléctrica son similares (positivos o negativos) en comparación a la superficie de las partículas en sí. No obstante, hay tantas excepciones a esta asunción, que la manera adecuada para determinar tanto la naturaleza (positiva o negativa) como la densidad de carga de las NPs es titularlas utilizando soluciones de concentración conocida de iones. La carga en la interfase de dispersión de la partícula es un fenómeno más complicado y menos entendido. En general, las superficies y moléculas naturales (membranas celulares, proteínas, lípidos, etc) exhiben carga negativa y, por el contrario, las superficies y moléculas sintéticas son catiónicas. También es inapropiado decir que hay NPs neutras basándose en datos de potencial Z, ya que no existen en suspensión debido a la carga que inevitablemente se forma en su superficie. Lo interesante es que la carga de las NPs puede variar en las diferentes fases del coloide. Según la regla de Cohen, si ambos, soluto y solvente, son aislantes, entonces el que tenga mayor permisividad relativa se vuelve positivo en la interfase. Un ejemplo de ello es que a temperatura ambiente las NPs de sílica son negativas en agua, pero positivas en benceno³⁰². En el caso de las NPs tipo ISCOMs (en PBS pH 7,4), se evidenció que tenían carga superficial negativa (Tabla 6). Esto es coherente, ya que las nanopartículas están compuestas por fosfatidilcolina y colesterol, componentes de las membranas celulares animales, y exhiben carga negativa a pH fisiológico. Además, las saponinas presentan grupos de ácido glucurónico, que, en caso de quedar expuestos en las NPs, también presentan carga negativa a pH fisiológico¹⁴⁷. Aunque la combinación de NPs con antígenos de carga positiva favorecería las interacciones electrostáticas entre ellos logrando una formulación más estable, se ha reportado que las NPs tipo ISCOMs o IMX pueden combinarse con diferentes antígenos por simple mezcla de los componentes, independientemente de la carga del antígeno.

Aunque idealmente las formulaciones con NPs serían monodispersas, esto es muy raro que ocurra en la realidad. El índice de polidispersidad (del inglés *polydispersity index*, PDI) obtenido por DLS típicamente describe la intensidad de luz dispersada por varias fracciones de partículas que difieren en su tamaño, y se calcula como: $(\text{ancho}/\text{media})^2$ para cada pico. En general se considera que una formulación con un valor $\leq 0,1$ de PDI es altamente monodispersa, mientras que formulaciones con valores de PDI de 0,1-0,4 y $>0,4$ son consideradas moderada o altamente polidispersas, respectivamente³⁰². Para nanoformulaciones orgánicas de uso farmacéutico, un valor de PDI de 0,2-0,3 se considera adecuado³⁰². Como se observa en la Tabla 6, las nanoformulaciones obtenidas tienen un valor de PDI entre 0,2 y 0,3, salvo algunas excepciones que presentan un valor mayor, de aproximadamente 0,4, y otra que es altamente polidispersa con un valor de PDI de 0,8. No obstante, la formulación de IMX QB80Uy obtenida por el método de diálisis es altamente monodispersa, ya que presenta un valor de PDI de 0,068. Si bien en general los valores son aceptables, lo óptimo sería lograr estandarizar el método para obtener sistemáticamente valores de PDI bajos, y similares entre los distintos “lotes” de formulaciones. Para ello, sería necesario estandarizar los reactivos, instrumentos e instalaciones utilizadas para las formulaciones, lo que podría lograrse trabajando en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (del inglés *Good Laboratory Practices*, GLP).

Tabla 6. Análisis de nanoformulaciones mediante DLS.

Método formulación	Saponina	composición	n muestra (tamaño; Pot. zeta)	Número Media (d.nm)	Porcentaje dentro del rango de tamaño	Distribución de tamaño por número	PDI	ZP (mV)
Inyección rápida de etanol	QB80Br	ISCOMs QB80Br-Fh LAP	5 ; 3	26,07 ± 2,127	100		0,439 ± 0,014	-10,2 ± 0,717
Inyección rápida de etanol	QB80Br	ISCOMPros QB80-Fh LAP-EEP	5 ; 3	137 ± 11,72	100		0,128 ± 0,015	-9,78 ± 0,828
Inyección rápida de etanol	QuilA® - Brenntag	ISCOMs QuilA®-OVA	3 ; 3	68,12 ± 1,462	100		0,215 ± 0,014	-8,51 ± 0,611
Inyección rápida de etanol	QuilA® - Brenntag	IMX QuilA®	3 ; 3	61,02 ± 4,545	100		0,243 ± 0,009	-7,42 ± 0,249
Inyección rápida de etanol	QB90Br	IMX QB90Br	3 ; 3	68,723 ± 5,271	100		0,202 ± 0,011	-7,18 ± 0,568
Inyección rápida de etanol	Quil A - Brenntag	ISCOMPro QuilA®-OVA-EEP	3 ; 3	233,8 ± 5,577	100		0,213 ± 0,01	-12,4 ± 0,971
Inyección rápida de etanol	QB90Br	ISCOMPro QB90 OVA EEP	3 ; 3	140,7 ± 16,87	100		0,427 ± 0,022	-14,2 ± 0,889
Inyección rápida de etanol	QuilA® Brenntag	IMXPro QuilA®-EEP	3 ; 3	235,3 ± 10,88	100		0,258 ± 0,027	-13,8 ± 0,693
Inyección rápida de etanol	QB90Br	IMXPro QB90	3 ; 3	212,5 ± 2,35	100		0,288 ± 0,024	-13,8 ± 0,503
Diálisis	QuilA® Brenntag	IMX Quil A®	5 ; 5	31,3 ± 1,617	100		0,246 ± 0,004	-10,3 ± 0,453
Diálisis	QuilA® Brenntag	IMX Quil A®	3 ; 3	31,84 ± 0,8489	100		0,339 ± 0,011	-5,43 ± 1,03
Diálisis	QB90Uy	IMX QB90Uy	3 ; 3	31,72 ± 0,9037	100		0,815 ± 0,045	-11,6 ± 1,11
Diálisis	QB80Uy	IMX QB80Uy	3 ; 3	27,45 ± 0,2294	100		0,068 ± 0,01	-7,52 ± 2,1

Con el avance en nanotecnología y vacunología, se han diseñado vacunas basadas en NPs para intentar superar las dificultades encontradas en las formulaciones de vacunas tradicionales y para lograr alcanzar un nivel de precisión y modulación de la respuesta inmune que no era posible con vacunas de primera generación. Las nanoformulaciones vacunales permiten alcanzar una mayor eficacia vacunal debido a que logran aumentar la estabilidad antigénica y la inmunogenicidad, entregar el antígeno en sitios blanco definidos, y generar una liberación antigénica sostenida en el tiempo. Las NPs brindan protección a antígenos y adyuvantes contra

la degradación enzimática o proteolítica. Además, debido a sus características fisicoquímicas únicas, pueden promover potentes respuestas tanto humorales como celulares. También podrían potencialmente cargar múltiples componentes (múltiples antígenos o antígenos quiméricos) en una única plataforma²⁹⁴. Por estas razones, definir y medir los atributos físicos de las NPs, tales como tamaño, forma y carga superficial, permite conocer si ocurrirá aumento sustantivo en la duración de la presentación antigénica, y en la internalización antigénica por parte de las DCs. Esto derivaría en una activación y maduración de las DCs que, a su vez, promovería la generación de una potente respuesta inmune, a la vez que permitiría conocer el fenotipo de la misma.

En este trabajo se logró caracterizar las NPs formuladas con saponinas de *Q. brasiliensis* o QuilA®, por dos métodos distintos (inyección rápida de etanol y diálisis) y en presencia de distintos antígenos (ISCOMs de *FhLAP*, influenza y OVA) o en ausencia de ellos (IMX). También se logró formular un novedoso sistema de adyuvantes combinando saponinas y EEP en NPs tipo ISCOMs o IMX. Las NPs formuladas con saponinas de *Q. brasiliensis* presentaban características similares a las formuladas con saponinas comerciales QuilA®. Mediante MET o HR-MET se logró evidenciar que las NPs tenían la forma y el tamaño característicos de los ISCOMs o IMX (tipo-caja de aproximadamente 40 nm), y mediante DLS se pudo corroborar la uniformidad de tamaño de las partículas en las formulaciones. Además, se logró determinar que las NPs presentaban un bajo índice de polidispersidad, indicando que las formulaciones son estables, aunque para corroborarlo sería importante realizar un ensayo de estabilidad de las nanoformulaciones. También se evidenció que las nanoformulaciones tenían un potencial Z negativo y de bajo valor absoluto en condiciones fisiológicas (buffer PBS, pH 7,4). Esta característica favorecería las interacciones electrostáticas con antígenos de carga positiva. Sin embargo, se ha demostrado que los ISCOMATRIX™ (formulados con saponinas comerciales tales como ISCOPREP o QS-21) ejercen su efecto adyuvante cuando son combinados mediante una simple mezcla con antígenos de distinta naturaleza^{143,304}. Una vez caracterizadas las NPs de las formulaciones, para poder utilizarlas como adyuvantes de vacunas de forma adecuada, nos propusimos estudiar la toxicidad de las mismas, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelo murino.

4.1.5. Toxicidad *in vitro*

Las saponinas son tóxicas para las células eucariotas. Esto ocurre en parte debido a que su núcleo apolar, que en el caso de las saponinas de *Q. brasiliensis* consiste en una aglicona triterpénica, interacciona con los lípidos de las membranas celulares, particularmente con el colesterol, causando poros y la subsiguiente lisis celular. Una manera de determinar la capacidad citolítica de las saponinas es mediante un ensayo de hemólisis, en el que se determina la concentración de saponinas que es capaz de causar lisis en el 50 % de los glóbulos rojos, denominada dosis hemolítica 50 (HD₅₀). Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que la HD₅₀ en glóbulos rojos de conejo para las fracciones QB90 y QB80 producidas en Brasil es de 103,4 µg/mL y de 55,5 µg/mL³⁰⁵ respectivamente (Fig. 20A). Respecto a las fracciones de saponinas producidas en Uruguay, Fb mostró una HD₅₀ de 40,4 µg/mL en eritrocitos de conejo (Fig. 20B), y QB90Uy de 102,4 µg/mL y QB80Uy 99,4 µg/mL en eritrocitos de ratón (Fig. 20C). Estos resultados implican que todas las fracciones de *Q. brasiliensis* presentaron menor capacidad hemolítica que QuilA®, cuya HD₅₀ es de 36,6, 36,8 y 64,9 µg/mL en las Fig. 20A, B y C respectivamente. Es importante destacar que esta diferencia de HD₅₀ para QuilA® entre las Fig. 20A y B respecto a 20C podría explicarse porque las dos primeras se ensayaron utilizando eritrocitos de conejo, y la última eritrocitos de ratón.

Respecto a los ISCOMs o IMX, ha sido ampliamente reportado que no poseen capacidad hemolítica, debido a que la aglicona de las saponinas se ubica en el núcleo polar de las NPs, y por lo tanto no puede interactuar con el colesterol de la membrana de las células³⁰⁶. En particular, previamente Cibulski y colaboradores reportaron que los ISCOMs formulados con QB90Br y el antígeno OVA no presentaban capacidad hemolítica¹³⁸. No obstante, evaluamos el efecto hemolítico de la novedosa formulación ISCOMPro, del EEP utilizado para formularlos, y como controles, también evaluamos la capacidad hemolítica de los ISCOMs con QB90Br y de esta saponina en forma soluble, y evidenciamos que ni los ISCOMs ni los ISCOMPro ni el EEP presentaban actividad hemolítica (Fig. 20D).

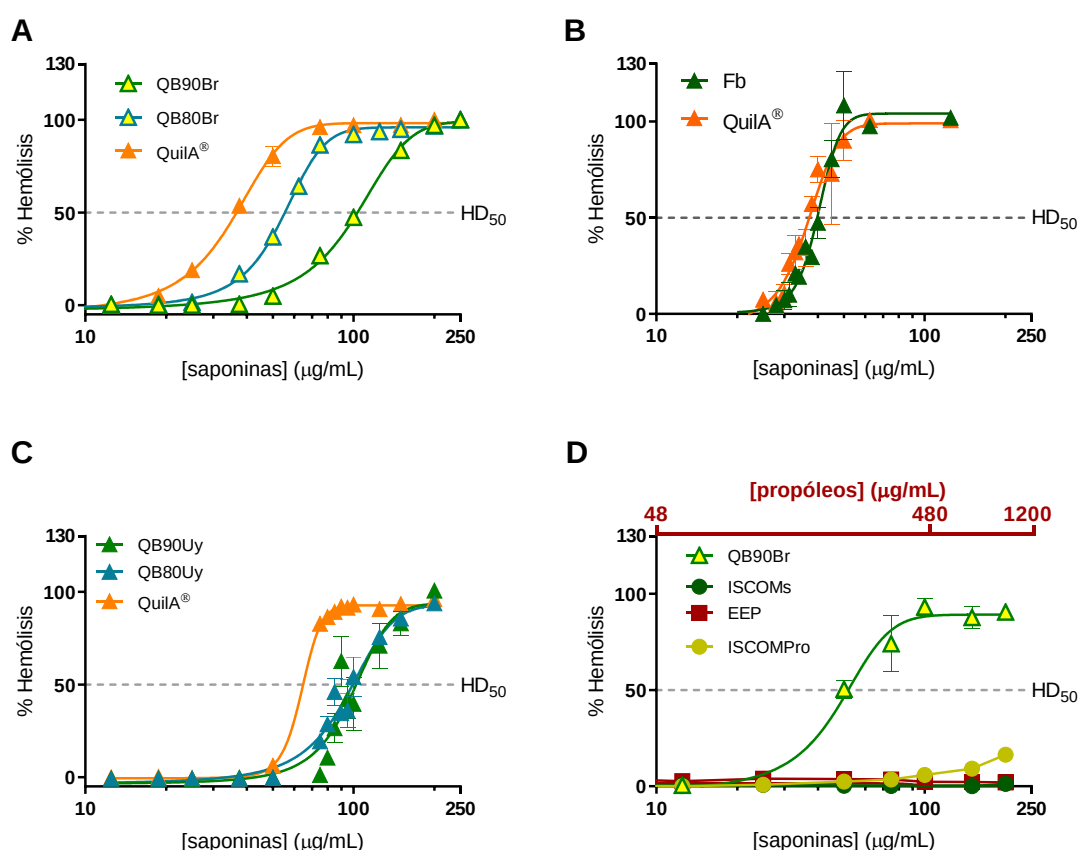


Figura 20. Determinación de HD_{50} de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*. Se muestra el porcentaje de hemólisis de eritrocitos de conejo (A&B) o de ratón (C&D) en función de la concentración de fracciones de saponinas, y a partir del ajuste sigmoideo se determina la HD_{50} de cada fracción. Se muestra la curva de hemólisis de QB90Br y QB80Br (A, gráfica modificada de Cibulski, Rivera-Patron, et. al. 2018), de Fb (B), y de QB90Uy y QB80Uy (C). En todos los casos se incluye también a la fracción de saponina comercial QuilA®. También se muestra la curva de hemólisis para ISCOMPro, EEP, ISCOMs y QB90Br (D). El eje superior (rojo) indica la concentración de EEP que contienen las formulaciones. En todos los casos se considera 100 % de hemólisis a la hemólisis causada por 250 µg/mL de QuilA®.

Además de la determinación de HD_{50} , se evaluó la citotoxicidad en las líneas celulares renales epiteliales MDCK mediante la técnica colorimétrica de MTT²⁷⁶, según se detalla en Materiales y Métodos. QB90Uy y QB80Uy mostraron un patrón de citotoxicidad similar a la causada por QuilA®, tanto en la línea celular Vero (Fig. 21A) como MDCK (Fig. 21B). No obstante, QB90Br mostró mayor toxicidad que las fracciones obtenidas en Uruguay y que QuilA®, tanto en células Vero a una concentración de 20 µg/mL, como en células MDCK a una concentración de 33

$\mu\text{g/mL}$. En cuanto a la citotoxicidad causada por IMXPro, se evidenció que en células MDCK presentaban menor toxicidad que el EEP, pero tenían un patrón similar a este. No obstante, los IMX formulados con la misma saponina (QB90Br) pero sin EEP, no presentaron citotoxicidad en células MDCK a las concentraciones ensayadas (Fig. 21C).

Además, para el estudio de la interacción entre las saponinas y distintas células inmunes, tales como macrófagos y BMDCs, era necesario saber en primera instancia qué concentración de saponinas era la adecuada para evitar la lisis celular, y poder estudiar la interacción de interés. Los resultados muestran que, para el caso de las BMDCs murinas y para la línea celular de macrófagos J774 A.1, la concentración adecuada para el trabajo *in vitro* era de 0,625 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 21D y E respectivamente). En la línea celular reportera de macrófagos murinos, RAW-Blue™, se observan niveles de toxicidad a mayor concentración de saponinas, evidenciándose que la viabilidad celular comienza a disminuir cuando la concentración de saponinas es mayor a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 21F).

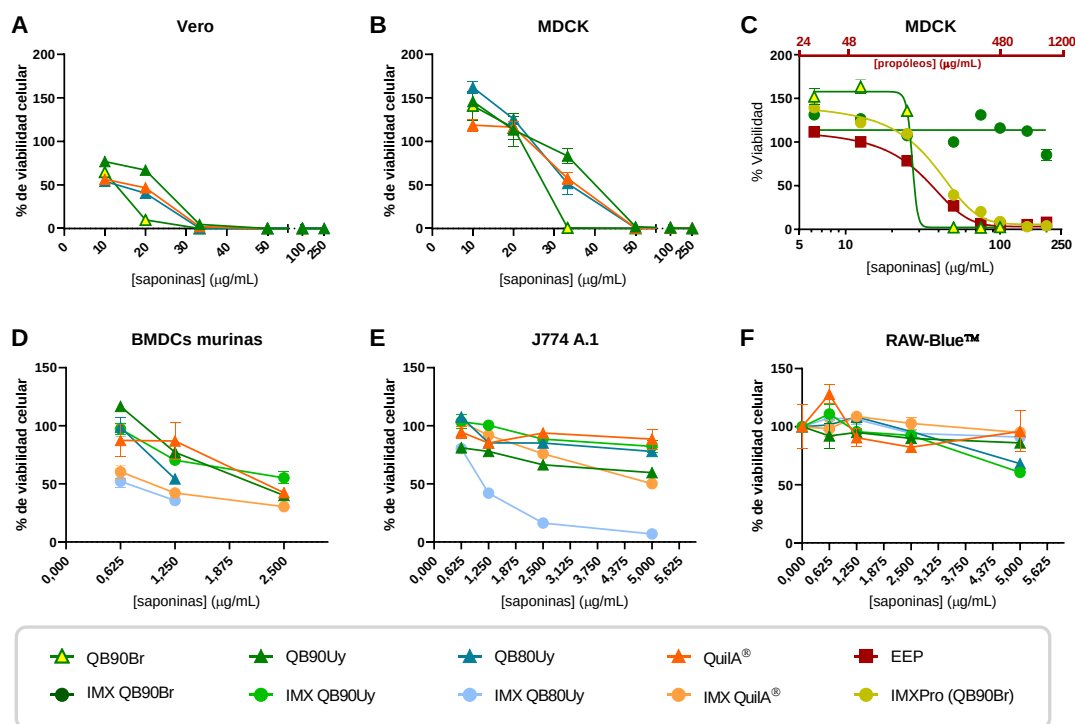


Figura 21. Citotoxicidad de las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* o sus IMX.

La viabilidad celular se midió mediante el método MTT luego de 24 hs de tratamiento de las líneas celulares con las distintas formulaciones. Se muestra la citotoxicidad causada por distintas concentraciones de QB90Br, QB90Uy, QB80Uy y QuilA®, en células Vero (A) y MDCK (B). En estas mismas células, se muestra la citotoxicidad causada por IMXPro formulados con la fracción QB90Br, y como control se muestra la citotoxicidad causada por el EEP, los IMX de QB90Br sin EEP, y la fracción QB90Br (C). El eje superior (rojo) indica la concentración de EEP que contienen las formulaciones. Además, se muestra la citotoxicidad causada por QB90Uy, QB80Uy, QuilA® y sus IMX en cultivo primario de BMDCs murinas (D), y en dos líneas celulares de macrófagos: J774 A.1 (E) y RAW-Blue™ (F). En todos los casos la viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células viables en relación a las células no tratadas (100 % de viabilidad), y se muestra la media $\pm$ SEM ($n=6$ para A, B, E y F; $n=5$ para C; $n=3$ para D).

4.1.6. Toxicidad *in vivo*

Para que una sustancia pueda ser utilizada como adyuvante, se debe demostrar que es segura en términos de toxicidad para el organismo en las cantidades que se administra. No obstante, es interesante destacar que parte de la capacidad adyuvante de ciertos adyuvantes de uso en

vacunas licenciadas reside en la capacidad de producir cierto daño celular/tisular local, estimulando así al sistema inmune innato y promoviendo luego una potente respuesta adaptativa contra el antígeno vacunal. En este sentido, la toxicidad causada por los adyuvantes debe ser suficiente para provocar esta estimulación del sistema inmune innato, es decir, se debe promover cierta reactividad, pero no debe provocar toxicidad local o sistémica que perjudique al organismo que sea inoculado con la formulación.

Es importante destacar que en los ensayos de toxicidad *in vitro* se utilizan animales de experimentación. Con el fin de respetar el principio de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) definido por Russel y Burch³⁰⁷, no se evaluaron todas las fracciones de saponinas, sino sólo aquellas fracciones de las que no se tenían datos para poder afirmar que no iban a causar toxicidad aguda en los animales. Previamente, nuestro grupo de investigación había determinado que la fracción QB90Br no causa toxicidad *in vivo* en los animales a las concentraciones de trabajo (10 µg/dosis)¹³⁸. Por tanto, no se realizó un nuevo ensayo para determinar la toxicidad *in vivo* de QB90Uy, sino que, debido a las similitudes en obtención y en ensayos *in vitro*, se considera similar a QB90Br. Se evaluó la toxicidad *in vivo* para Fb, QB80Br, y para la novedosa nanoformulación ISCOMPro. Para ello, se inocularon ratones cepa CD1 (n=5) por vía s/c en la zona interescapular con distintas concentraciones de cada formulación. Además, se inocularon grupos de ratones con distintas concentraciones de QuilA® como referencia. Los animales se monitorearon durante 72 horas, y se evaluó la sobrevida, así como también signos de toxicidad local o sistémica. Los animales inoculados con hasta 65 µg de Fb (Fig 22A) o hasta 150 µg de QB80 (Fig 22B) no presentaron signos de toxicidad local o sistémica, y mostraron un 100 % de la sobrevida. Los animales inoculados con hasta 65µg/ds de QuilA® no mostraron signos de toxicidad ni descenso en la sobrevida (Fig. 22A), no obstante, si se aumenta la concentración de inoculación a 75 µg/ds de QuilA® se observa un descenso al 60 % de la sobrevida a las 72 horas post-inoculación (Fig. 22B). Con estos resultados se comprueba que la inoculación por vía s/c en ratones de hasta 65 µg/ds de Fb o QuilA® o de hasta 150 µg/ds de QB80 es segura en términos de toxicidad local o sistémica.

Los resultados indican que las fracciones de saponinas QB90, QB80, QuilA® no causan toxicidad local o sistémica a las concentraciones de trabajo (10 o 5 µg/ds) al ser inoculadas por vía s/c.

En cuanto a las nanoformulaciones tipo ISCOMs o ISCOMATRIX, ha sido ampliamente reportado que no causan toxicidad local o sistémica^{139,308}. Por otra parte, se ha demostrado que el EEP no es tóxico para los animales y puede catalogarse como "no tóxico"¹⁷². En este sentido, se ha reportado que la dosis letal 50 (DL₅₀) varía entre 2,0 y 7,3 mg/kg en ratones. Además, se sugiere que la administración segura para humanos podría variar entre 1,4 mg/kg y por día, o aproximadamente 70 mg/día¹⁶¹. En otro estudio realizado en ratas, se administraron diferentes concentraciones (1, 3 and 6 mg/kg/día) de diferentes extractos de propóleos (agua o etanol), y se varió el tiempo de administración (30, 90 y 150 días). No se observaron alteraciones significativas en los lípidos totales, triglicéridos, colesterol, concentraciones de HDL-colesterol, ni en las actividades específicas de AST ni LDH¹⁷⁸. Sin embargo, debido a que no se conocía la toxicidad local o sistémica que pueda generar la nueva formulación ISCOMPro (ISCOMs conteniendo EEP) que hemos diseñado, se realizó un ensayo de toxicidad *in vivo*, en el que se inoculó por vía s/c en la zona interescapular dicha formulación conteniendo 10 µg/ds de fracción de saponinas QB90Br y 48 µg/ds de EPP (dosis de trabajo), así como también 3 veces la dosis de trabajo, y se evaluó a los animales cada 24 hs durante 14 días. Los animales no mostraron signos

de toxicidad local ni sistémica. También se les monitoreó el peso corporal, y no sólo no mostraron disminución de éste, sino que continuaron aumentando el peso corporal de forma similar a los animales control (inoculados con PBS, Fig. 22C).

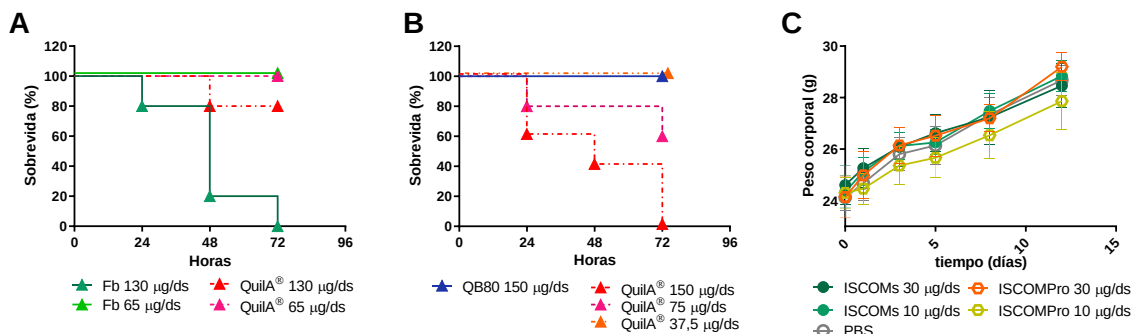


Figura 22. Evaluación de toxicidad *in vivo* de fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*. Se inocularon ratones machos de la cepa CD1 ($n=5$) con 100 µL de una de las siguientes soluciones: QuilA® o Fb (130,0; 65,0; 32,5; 16,75 µg/ds) en solución salina (A), o QuilA® o QB80 (150,0; 75,0; 37,5; 18,75 µg) en solución salina (B). Los animales fueron monitoreados cada 24 horas durante 3 días (72 horas), en busca de signos de toxicidad y letalidad. En las figuras se indica la supervivencia (expresada en porcentaje) de distintos grupos a lo largo de todo el ensayo. Se inocularon ratones hembra cepa CD1 ($n=5$) por vía sub-cutánea en la región interescapular con 100 µL de nanoformulaciones tipo ISCOMs o ISCOMPro conteniendo 10 o 30 µg/ds de fracción QB90Br y 10 o 30 µg/ds ovoalbúmina. Las nanoformulaciones ISCOMPro contenían 48 ó 144 µg/ds de EEP respectivamente. Los animales se pesaron diariamente durante 14 días y la evolución del peso corporal se muestra en (C).

En este trabajo se lograron producir fracciones de saponinas a partir de extractos foliares de *Q. brasiliensis*, de acuerdo a métodos estandarizados²⁶⁶, con características similares a las fracciones producidas por nuestros colaboradores de Brasil y a QuilA®. A partir de éstas se logró formular exitosamente NPs tipo ISCOMs con distintos antígenos, y también sin antígenos (IMX), mediante dos métodos diferentes, diálisis e inyección rápida de etanol. Las NPs formuladas fueron caracterizadas mediante MET o HR-MET y DLS, para determinar la forma, la distribución de tamaño de las partículas y el potencial Z de las formulaciones, encontrándose una vez más características similares a las NP formuladas con QuilA®. El protocolo utilizado, incluyendo su posterior caracterización mediante (HR)-MET y DLS, fue publicado en un libro de protocolos sobre métodos estandarizados para el trabajo con metabolitos secundarios vegetales²⁶⁷.

Por otro lado, se diseñó y se logró formular un novedoso sistema de adyuvantes con NPs tipo ISCOMs o IMX conteniendo fracciones de saponinas nativas y EEP producido a partir de propóleos de *A. mellifera* extraídos del Depto. de Soriano, manteniendo características fisicoquímicas de los ISCOMs o IMX sin EEP, pero al contener una sustancia inmunoestimulante como el EEP, con el potencial de promover respuestas mas potentes o robustas.

También se evaluó la toxicidad generada por estas fracciones o sus nanoformulaciones, ya sea *in vitro*, para lo que se utilizaron cultivos primarios de células o líneas celulares, y también *in vivo* en modelo murino, y se evidenció que, a las concentraciones de trabajo, ni las fracciones de saponinas ni sus nanoformulaciones causaban toxicidad si se inoculaban por vía subcutánea, para ser utilizadas como adyuvantes de vacunas.

En los capítulos siguientes evaluamos cómo se comportan estas formulaciones al ser utilizadas como adyuvantes, tanto a nivel de la respuesta inmune innata como adaptativa, *in vitro* o *in vivo* en modelo murino.

4.2. Capítulo 2: Efecto de los SBAs sobre la inmunidad innata

La estimulación del sistema inmune innato por parte de los adyuvantes es crucial, ya que los componentes del sistema inmune innato son quienes estimularán y dirigirán la respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de blancos moleculares específicos, modulando finamente la respuesta de anticuerpos y de células $T^{309-314}$. Por esta razón nos propusimos estudiar cómo los SBAs de *Q. brasiliensis* estimulaban al sistema inmune innato, en comparación con los SBAs de saponinas comerciales (QuilA®). En este sentido, estudiamos qué poblaciones de granulocitos y de linfocitos son reclutadas a los órganos linfoides secundarios a nivel local, en el dLN y a nivel sistémico, en el bazo, 6 y 24 horas post-inoculación por vía s/c de los distintos adyuvantes. También estudiamos la interacción de estos adyuvantes con diferentes PRRs, y también la interacción con el mediador MyD88, utilizando células reporteras. Además se estudió la activación de APCs, tales como macrófagos y BMDCs, en particular la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos, y la internalización y el procesamiento antigénico en BMDCs utilizando el antígeno modelo OVA marcado con una sonda fluorescente para este fin. Asimismo, se estudió la producción de citoquinas por estas APCs estimuladas con los SBA de *Q. brasiliensis*, incluyendo la producción de IL-1 β por parte de BMDCs y su implicancia en la activación del complejo inflamasoma.

4.2.1. Reclutamiento en bazo y dLN a tiempos tempranos (6 y 24 hs post inoculación)

Uno de los mecanismos de acción de los adyuvantes es la inducción de inflamación, es decir, el reclutamiento de células del sistema inmune innato al sitio de inoculación, y la activación de éstas, lo que deriva en la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias por parte de las células activadas. Asimismo, una vez reclutadas y activadas en el sitio de inoculación, se produce la migración de estas células a los órganos linfoides secundarios, tales como el dLN y el bazo para desencadenar la respuesta inmune. Por esta razón, el reclutamiento de células del sistema inmune innato por parte de los adyuvantes a estos órganos linfoides secundarios es un buen indicador de la activación de la respuesta inmune. Previamente reportamos el reclutamiento de granulocitos y linfocitos a las 24 y 48 hs post inoculación por vía s/c de 10 μ g de QB90 o 2,5 μ g de ésta en ISCOMs, evidenciando un aumento en el reclutamiento de células totales en bazo y dLN a ambos tiempos ensayados, y además que ese aumento de células se correlaciona con un aumento de las poblaciones de neutrófilos, células NKs, DCs, células B y T^{305} . Para continuar con la caracterización de la respuesta inmune innata desencadenada por estos SBAs, en esta tesis se estudió el reclutamiento de granulocitos y linfocitos en el dLN y en el bazo a las 6 y 24 horas luego de la inoculación por vía s/c de 10 μ g de QB90 o 2,5 μ g de ésta en sus IMXs, mediante inmunofenotipificación por citometría de flujo.

No se observa un aumento en los granulocitos reclutados al dLN relativo al grupo SF a las 6 horas post-inoculación (Fig. 23A, barras lisas). Sin embargo, a las 24 horas post-inoculación se observa que los animales inoculados con QB90 o IMXQuilA® presentan un mayor incremento relativo de granulocitos totales, mientras que los animales inoculados con el resto de los SBAs muestran una tendencia similar (Fig. 23A, barras rayadas). En el bazo, a las 6 horas post-inoculación, se observa que los animales inoculados con QB90 tienen un mayor incremento relativo en el total de granulocitos reclutados (medias cercanas a 2), mientras que los SBAs formulados con QuilA® muestran una tendencia similar (Fig. 23B, barras lisas). No se observan cambios en el incremento relativo a las 24 horas en el bazo (Fig. 23B, barras rayadas). Al observar la distribución de poblaciones de granulocitos tanto a nivel local como sistémico, se observa que las poblaciones

que contribuyen principalmente a este aumento en la globalidad de granulocitos son los neutrófilos, DCs y macrófagos, y en el dLN además, los monocitos (Fig. 23C&D).

En cuanto a la globalidad de los linfocitos, no se observan diferencias entre los grupos inoculados con SBAs y el grupo control en el dLN a las 6 hs post inoculación (Fig. 23E). No obstante, a las 24 hs post inoculación los grupos inoculados con QB90 o con IMXQuila® muestran mayor incremento relativo que el control, y el resto de los grupos inoculados con SBAs muestran una tendencia similar, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas (Fig. 23E). En el bazo a las 6 hs post inoculación, los grupos inoculados con SBAs muestran una media de valores cercanos al doble de la media del grupo control, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas (Fig. 23F, barras lisas). A las 24 hs post inoculación, no se observan diferencias entre grupos, siendo el incremento relativo menor a 1 en todos los grupos inoculados con SBAs (Fig. 23F, barras rayadas). Al estudiar la distribución de las poblaciones linfocitarias a las 24 hs post inoculación, se observa que en el dLN las poblaciones que más contribuyen al mayor reclutamiento en los grupos inoculados con SBAs son los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y también, aunque en menor medida, las células B (Fig. 23G). En el bazo las poblaciones que más contribuyen al mayor reclutamiento de linfocitos son principalmente las células B, y también las células T CD4⁺ y T CD8⁺ (Fig. 23H).

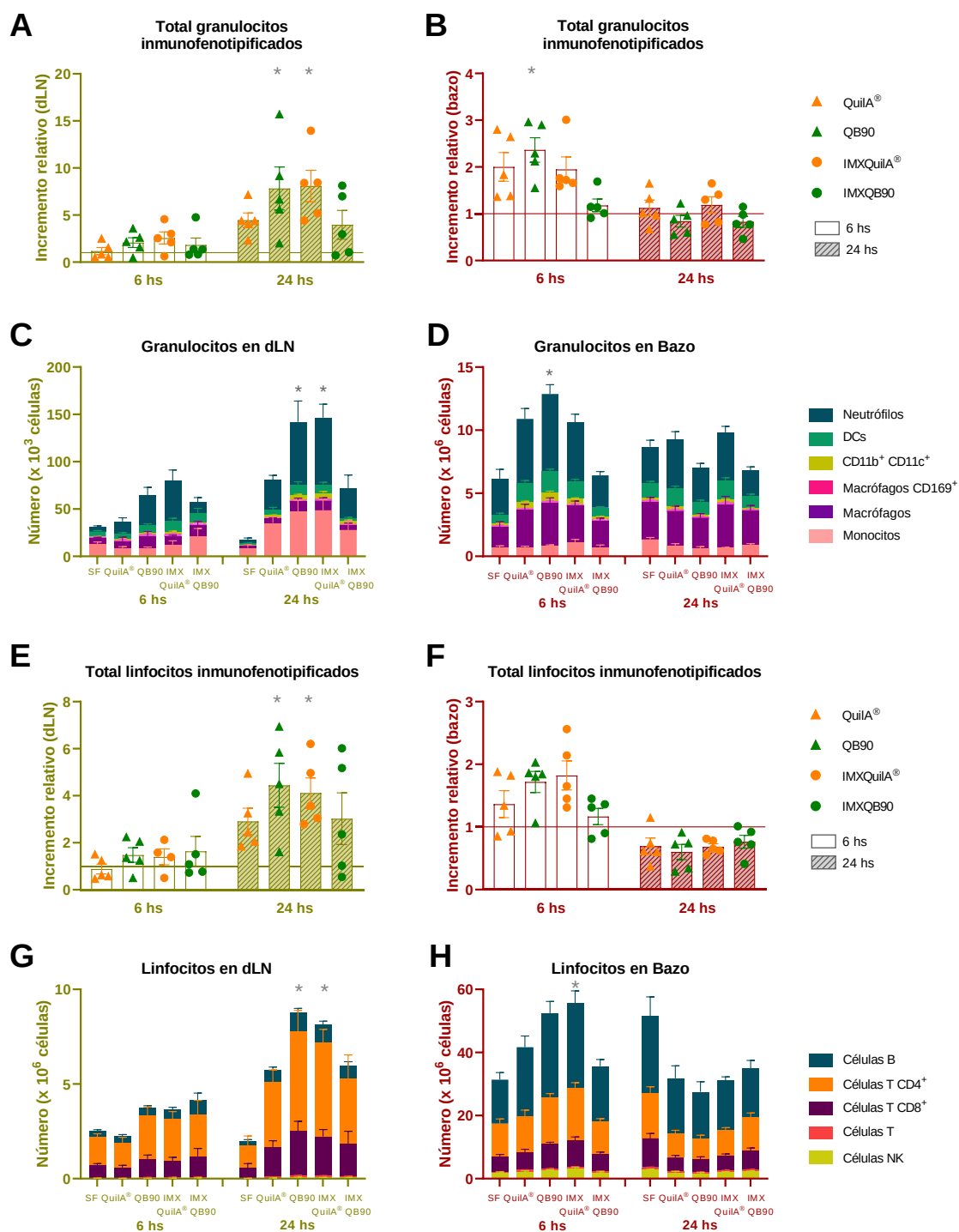


Figura 23. Poblaciones celulares reclutadas en bazo y dLN a 6 y 24 horas post inoculación. Los animales se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una de las siguientes formulaciones: QuilA® (10 μ g), QB90 (10 μ g), IMX QuilA® (2,5 μ g de QuilA®), IMX QB90 (2,5 μ g de QB90), o SF como control. A las 6 (barras lisas) y 24 (barras rayadas) horas post-inoculación se obtuvo uno de los dLN y el bazo, y se estudiaron las poblaciones de granulocitos y linfocitos mediante citometría de flujo. Se muestra el total de granulocitos expresado como el incremento relativo del número de granulocitos reclutados en cada grupo respecto a la media del grupo control en dLN (A) y en bazo (B) y también el total de granulocitos en número absoluto y con las poblaciones granulocitarias identificadas y expresadas en número absoluto en dLN (C) y en bazo (D). Además, se muestra el total de linfocitos expresado como el incremento relativo del número de linfocitos reclutados en cada grupo respecto a la media del grupo control en dLN (E) y en bazo (F) y también el total de linfocitos en número absoluto y con las poblaciones linfocitarias identificadas y expresadas en número absoluto en dLN (G) y en bazo (H). Se muestra la media $\pm$ SEM, y en A, B, E y F también los valores individuales (n=5).

Los datos se compararon contra el grupo control (SF) correspondiente a cada tiempo (6 o 24 hs, asteriscos grises), mediante el test de Kruskal-Wallis. * indica $p < 0,05$.

A tiempos tan tempranos como 6 hs post inoculación, a nivel del dLN se observa que los animales inoculados con IMXQuila® mostraron un mayor aumento relativo en el reclutamiento de neutrófilos que el control, mientras que el grupo inoculado con QB90 muestra una media similar a esta formulación (Fig. 24A, barras lisas). A las 24 horas este aumento se consolida, tanto para el grupo inoculado con IMXQuila® como para el inoculado con QB90, ya que se observa que ambos grupos muestran un mayor incremento relativo en el reclutamiento de neutrófilos respecto al control (Fig. 24A, barras rayadas). En cuanto al reclutamiento de DCs en el dLN, no se observan diferencias entre grupos a las 6 horas post inoculación, pero a las 24 horas se observa que los animales inoculados con IMXQuila® presentaron mayor incremento relativo que el grupo control en el reclutamiento de esta población celular (Fig. 24B). En el reclutamiento de macrófagos tampoco se observan diferencias entre grupos a las 6 ni a las 24 horas, aunque en este último tiempo el aumento relativo en todos los grupos es de más del doble (Fig. 24C). En la subpoblación de macrófagos CD169⁺, aunque tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos, se observa que a ambos tiempos (6 y 24 horas) los grupos inoculados con SBAs muestran un valor de incremento relativo cercano al doble de la media del grupo control (Fig. 24D). Estudios previos con QS-21 demostraron que cuando esta saponina es inoculada por vía intramuscular se acumula rápidamente en macrófagos CD169⁺ residentes en el dLN, donde desencadena una respuesta innata local. Además, demostraron que la depleción de estas células impide el reclutamiento de células del sistema inmune innato al dLN, la maduración fenotípica de las DCs, y también inhibe la respuesta adaptativa de células B y T contra el antígeno que se co-administre³¹⁵. En nuestro ensayo se detectó la presencia de macrófagos CD169⁺ en los animales inoculados con SBAs, tanto en el bazo como en dLN, y en este último se evidenció un aumento relativo de aproximadamente el doble al grupo control, desde tiempos tan tempranos como 6 horas post inoculación, y esta tendencia al aumento se mantiene al menos hasta 24 horas post inoculación.

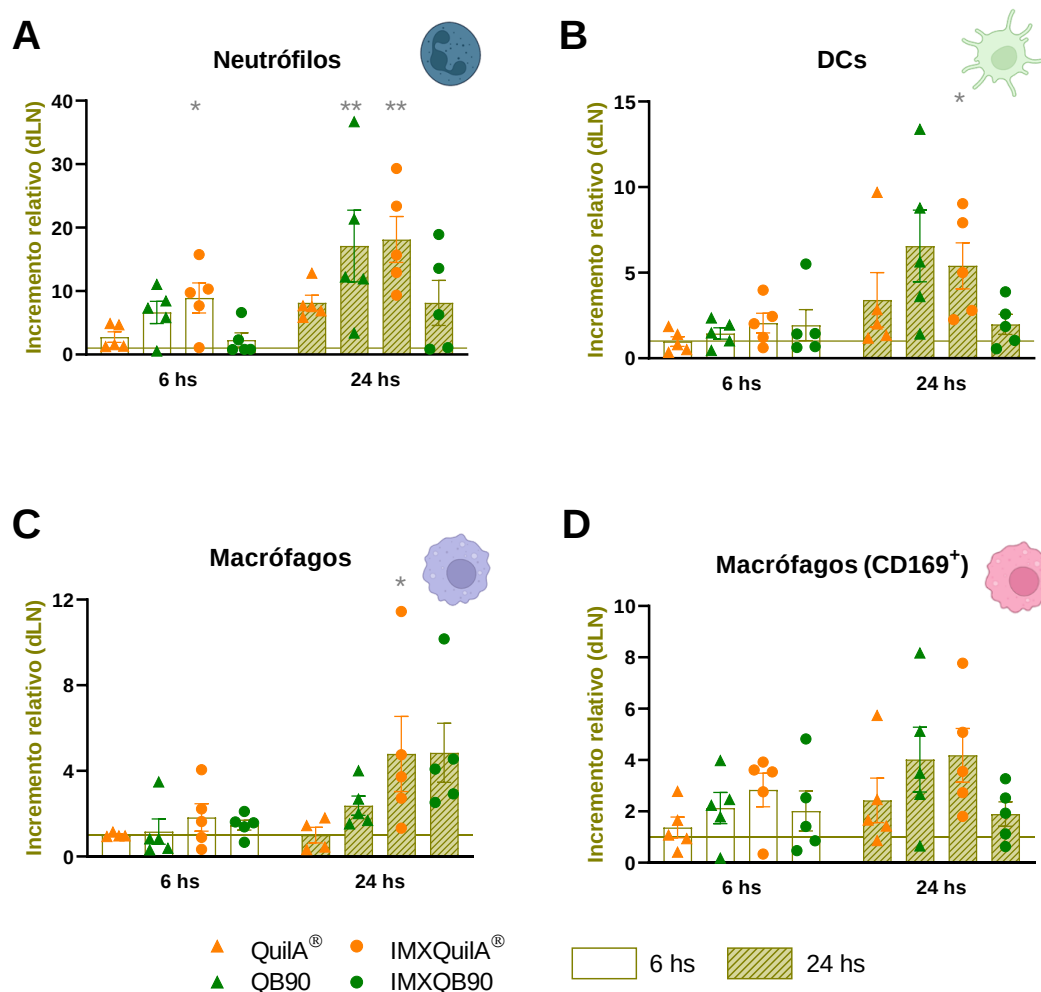


Figura 24. Reclutamiento de granulocitos en dLN 6 y 24 horas post inoculación. Los animales se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una de las siguientes formulaciones: QuilA® (10 µg), QB90 (10 µg), IMX QuilA® (2,5 µg de QuilA®), IMX QB90 (2,5 µg de QB90), o SF como control. A las 6 (barras lisas) y 24 (barras rayadas) horas post-inoculación se obtuvo uno de los dLN, y se estudiaron las poblaciones de granulocitos por inmunofenotipificación mediante citometría de flujo. Se muestra el incremento relativo del número de células reclutadas en cada grupo respecto a la media del grupo control (SF) de las siguientes poblaciones: neutrófilos (CD11b⁺ Gr1⁺, A), células dendríticas (CD11b⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺, B), macrófagos (F4/80⁺ MHC-II⁺, C), macrófagos CD169⁺ (F4/80⁺ MHC-II⁺ CD169⁺, D). Se muestra la media ± SEM y los valores individuales (n=5). Los datos se compararon contra el grupo control (SF) correspondiente a cada tiempo (6 o 24 hs, asteriscos grises), mediante el test de Kruskal-Wallis. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$.

A diferencia de lo observado a nivel local, a nivel sistémico se observa que los animales inoculados con QB90 fueron capaces de reclutar neutrófilos (CD11b⁺ Gr1⁺) y DCs convencionales (CD11b⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺) en mayor medida que el control (SF) 6 horas post-inoculación (Fig. 25 A&B, barras lisas). Los animales inoculados con QuilA® o IMXQuilA® mostraron una media del incremento relativo de neutrófilos, DCs convencionales y macrófagos cercana al doble del grupo control a las 6 horas post-inoculación (Fig. 25A-C, barras lisas). Además, los animales inoculados con QB90 o con QuilA® mostraron un incremento en el reclutamiento de macrófagos CD169⁺ (F4/80⁺ MHC-II⁺ CD169⁺) de 1,5 veces respecto a SF, aunque los animales inoculados con ambos IMX mostraron un reclutamiento de esta subpoblación de macrófagos similar al grupo control (Fig. 25D, barras lisas). A las 24 horas post inoculación, las diferencias encontradas se restituyen

a valores similares a SF (Fig. 25, barras rayadas). Si bien se observan ciertas sutilezas en el aumento relativo, debido a un n pequeño y a la gran dispersión encontrada dentro de cada grupo, los datos no permiten obtener una conclusión contundente en este sentido.

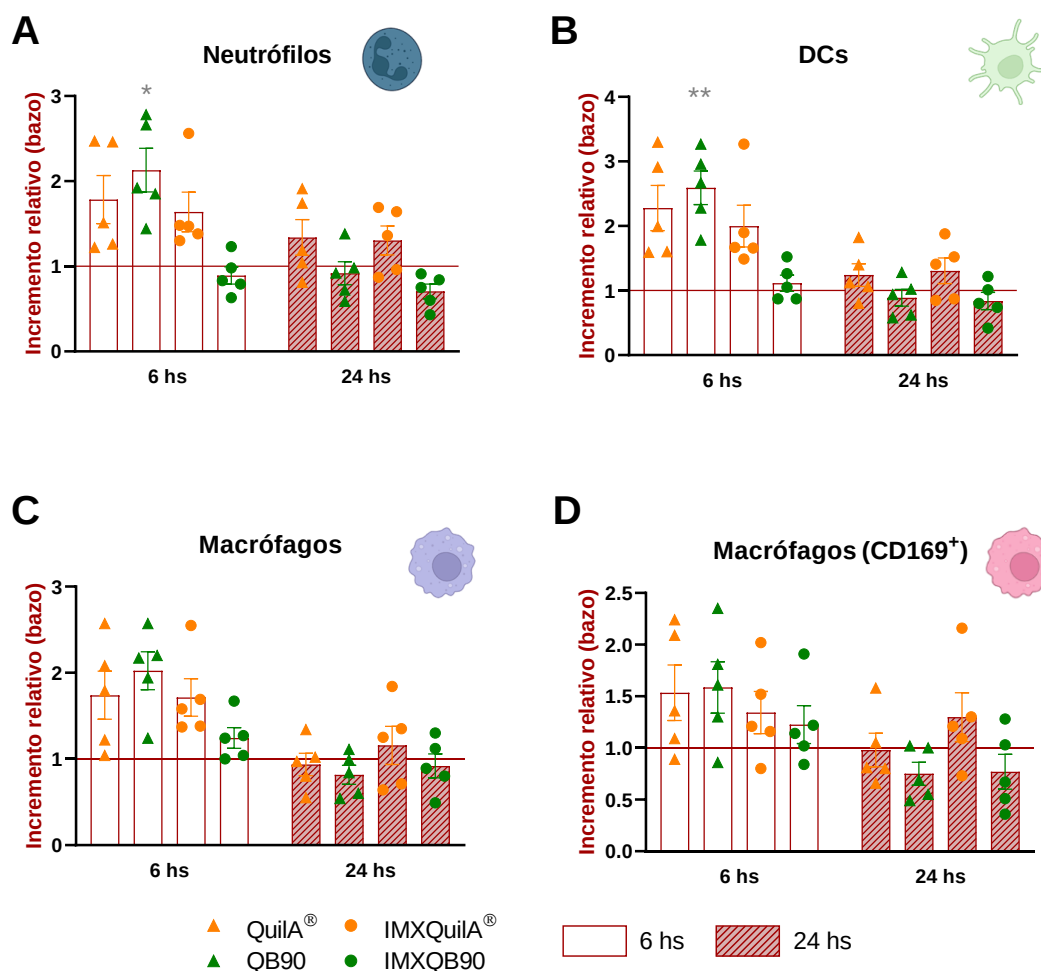


Figura 25. Reclutamiento de granulocitos en bazo 6 y 24 horas post inoculación. Los animales se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una de las siguientes formulaciones: QuilA® (10 µg), QB90 (10 µg), IMX QuilA® (2,5 µg de QuilA®), IMX QB90 (2,5 µg de QB90), o SF como control. A las 6 (barras lisas) y 24 (barras rayadas) horas post-inoculación se obtuvieron los bazos, y se estudiaron las poblaciones de granulocitos mediante citometría de flujo. Se muestra el incremento relativo del número de células reclutadas en cada grupo respecto a la media del grupo control (SF) de las siguientes poblaciones: neutrófilos (CD11b⁺ Gr1⁺, A), células dendríticas (CD11b⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺, B), macrófagos (F4/80⁺ MHC-II⁺, C), macrófagos CD169⁺ (F4/80⁺ MHC-II⁺ CD169⁺, D). Se muestra la media ± SEM y los valores individuales ($n=5$). Los datos se compararon contra el grupo control (SF) correspondiente a cada tiempo (6 o 24 hs, asteriscos grises), mediante el test de Kruskal-Wallis. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$.

En el dLN no se observan diferencias en el incremento relativo del reclutamiento de linfocitos a las 6 horas post-inoculación entre los grupos inoculados con SBAs y el grupo control (Fig. 26, barras lisas). Sin embargo, a las 24 horas se observa que los grupos inoculados con QB90 o con IMXQuilA® mostraron un mayor aumento relativo de células NK (Fig. 26A, barras rayadas), células B (Fig. 26B, barras rayadas) y células T (Fig. 26C, barras rayadas), particularmente células T CD8⁺ (Fig. 26D, barras rayadas) y células T CD4⁺ (Fig. 26E, barras rayadas). Las otras dos formulaciones (QuilA® e IMXQB90) presentaron valores de incremento relativo elevados (entre 3 y 6 con respecto al grupo control), aunque estas diferencias no se consolidaron. La relación

entre linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ se mantuvo constante con las distintas condiciones de estimulación.

Es importante destacar que no se detectaron diferencias en el reclutamiento de granulocitos en el grupo inoculado con IMXQB90, ni a las 6 ni a las 24 hs, ni en el bazo ni en el dLN. Si bien algunos individuos en este grupo mostraron valores muy por encima de los valores del grupo control, la dispersión encontrada entre los individuos de este grupo fue muy amplia, y por lo tanto no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

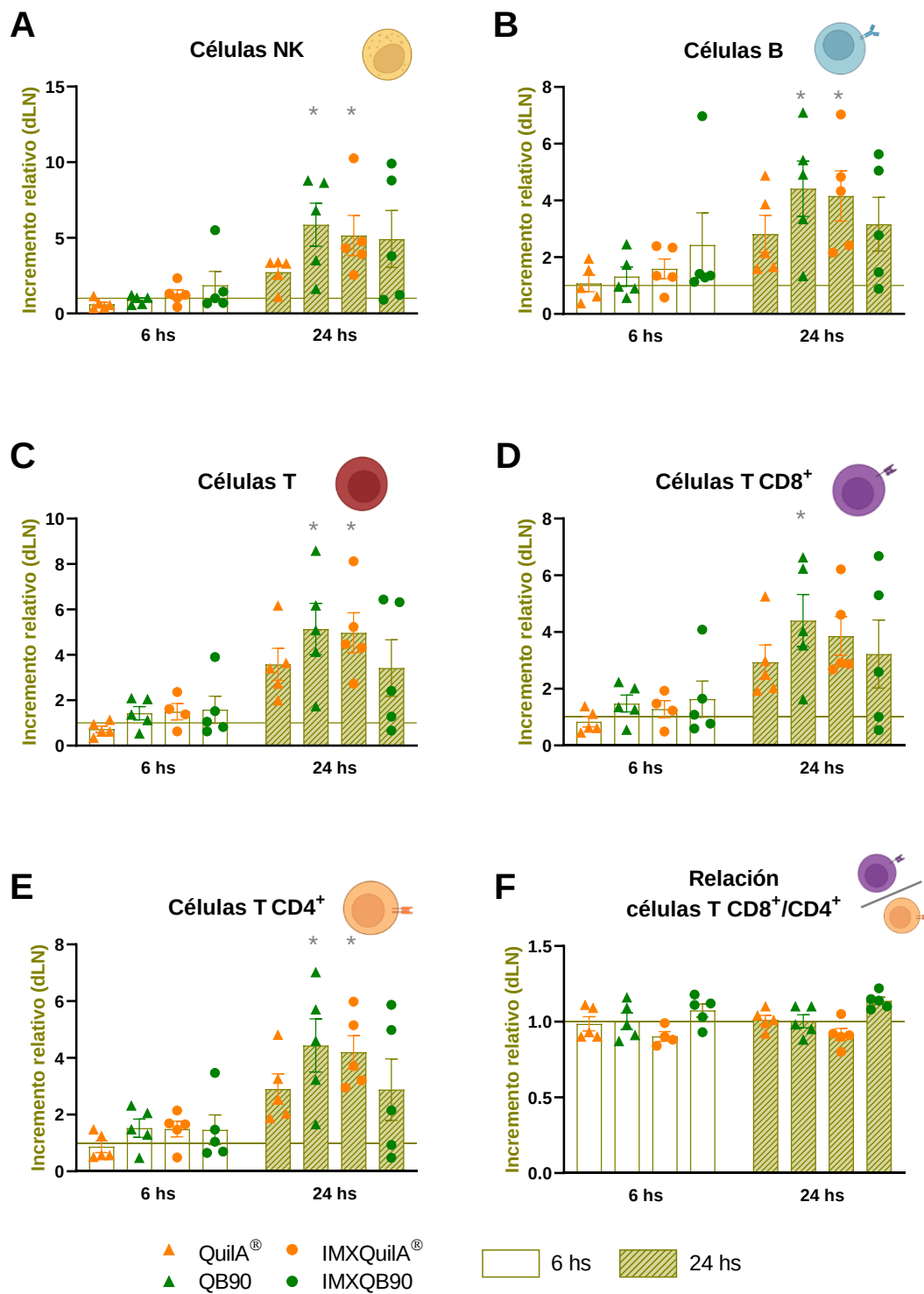


Figura 26. Reclutamiento de linfocitos en dLN 6 y 24 horas post inoculación. Los animales se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una de las siguientes formulaciones: QuilA® (10 µg), QB90 (10 µg), IMX QuilA® (2,5 µg de QuilA®), IMX QB90 (2,5 µg de QB90), o SF como control. A las 6 (barras lisas) y 24 (barras rayadas) horas post-inoculación se obtuvo uno de los dLN, y se estudiaron las poblaciones de linfocitos mediante citometría de flujo. Se muestra el incremento relativo del número de células reclutadas en cada grupo respecto a la media del grupo control (SF) de las siguientes poblaciones: células NK (CD3⁺ CD19⁻ CD49b⁺, A), células B (CD3⁺ CD19⁺, B), células T (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁻ CD8⁻, C), células T CD8⁺ (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁻ CD8⁺, D), células T CD4⁺ (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁺ CD8⁻, E) y la relación entre el incremento relativo de células T CD8⁺ y las células T CD4⁺ (F). Se muestra la media ± SEM y los valores individuales (n=5). Los datos se compararon contra el grupo control (SF) correspondiente a cada tiempo (6 o 24 hs, asteriscos grises), mediante el test de Kruskal-Wallis. * indica $p < 0,05$.

En cuanto a las poblaciones linfocitarias, no se detectaron diferencias en el incremento relativo de células NK respecto al grupo control a las 6 ni a las 24 hs a nivel sistémico (Fig. 27A). No obstante, en el grupo inoculado con QB90 se detectó un aumento en el incremento relativo de células B a las 6 horas post inoculación, aunque a las 24 horas se observan valores similares al grupo control (Fig. 27B). En cuanto a las células T, células T CD8⁺ y células T CD4⁺, no se observan diferencias estadísticamente significativas del incremento relativo respecto al control de los grupos inoculados con SBAs, aunque en estos grupos se observa que el incremento relativo es de aproximadamente una vez y media respecto al grupo SF (Fig. 27 CD& E). La relación de células T CD8⁺/CD4⁺ permaneció incambiada en todas las condiciones (Fig. 27F).

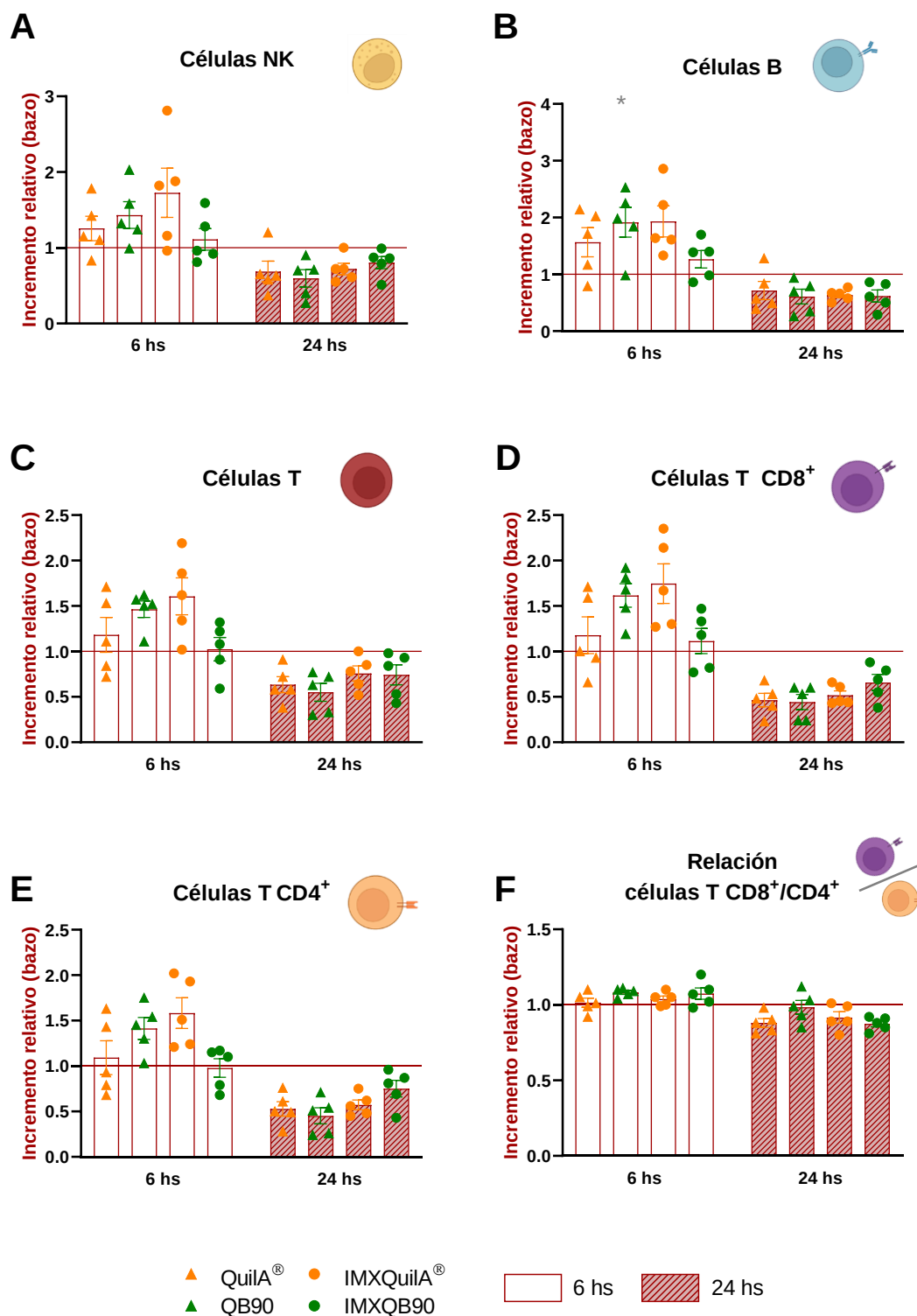


Figura 27. Reclutamiento de linfocitos en bazo 6 y 24 horas post inoculación. Los animales se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una de las siguientes formulaciones: QuilA® (10 µg), QB90 (10 µg), IMX QuilA® (2,5 µg de QuilA®), IMX QB90 (2,5 µg de QB90), o SF como control. A las 6 (barras lisas) y 24 (barras rayadas) horas post-inoculación se obtuvieron los bazos, y se estudiaron las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. Se muestra el incremento relativo del número de células reclutadas en cada grupo respecto a la media del grupo control (SF) de las siguientes poblaciones: células NK (CD3⁻ CD19⁻ CD49b⁺, A), células B (CD3⁻ CD19⁺, B), células T (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁻ CD8⁻, C), células T CD8⁺ (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁺ CD8⁺, D), células T CD4⁺ (CD3⁺ CD19⁻ CD4⁺ CD8⁻, E) y la relación entre el incremento relativo de células T CD8⁺ y las células T CD4⁺ (F). Se muestra la media ± SEM y los valores individuales (n=5). Los datos se compararon contra el grupo control (SF) correspondiente a cada tiempo (6 o 24 hs, asteriscos grises), mediante el test de Kruskal-Wallis. * indica p < 0,05.

Los datos obtenidos muestran que los adyuvantes formulados con QB90 mostraron una estimulación del sistema inmune innato similar al inducido por los adyuvantes basados en QuilA®. Si bien se encontraron ciertas diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, las mismas fueron puntuales, y en general lo que se observa es una tendencia hacia el aumento del reclutamiento de granulocitos y linfocitos en el dLN a las 6 hs que se consolida a las 24 hs, y llamativamente a nivel sistémico (bazo) a tiempos tempranos.

Los resultados obtenidos concuerdan a grandes rasgos con nuestros reportes previos³⁰⁵, y contribuyen a caracterizar la cinética de activación de la respuesta inmune innata por parte de SBAs de *Q. brasiliensis*. No obstante, en aquellos ensayos se obtuvieron mayores diferencias que en este caso. Estas diferencias quizás puedan explicarse porque se utilizó otro lote de producción de las saponinas. En nuestra publicación previa la fracción QB90 fue producida por nuestros colaboradores de la UFRGS, a partir de hojas colectadas de especímenes de *Q. brasiliensis* en el sur de Brasil, mientras que en este caso la fracción QB90 utilizada fue producida en nuestro laboratorio, a partir de hojas de *Q. brasiliensis* colectadas en el Parque Batlle de Montevideo. La producción de saponinas por parte de las distintas especies vegetales, incluyendo a *Q. brasiliensis*, está influenciada por las características del individuo, y también por los factores de estrés a los que está sometido (radiación solar, temperatura, ausencia o exceso hídrico, plagas, etc)³¹⁶.

Aunque al estudiar las poblaciones por separado se observan sutiles diferencias en el reclutamiento de las distintas poblaciones de granulocitos y linfocitos de los grupos inoculados con SBAs respecto al grupo control, es importante destacar que esta inmunofenotipificación sólo abordó poblaciones mayoritarias, que aunque fueron definidas con la máxima cantidad de marcadores de superficie con los que se contaba, es posible perfeccionar esta inmunofenotipificación, ya sea para caracterizar a las poblaciones utilizando más marcadores de superficie, o para detectar otras subpoblaciones celulares que no pudieron ser contempladas en este caso. En este trabajo se caracterizó por primera vez el reclutamiento de los macrófagos CD169⁺ por parte de SBAs de *Q. brasiliensis*, en el futuro sería interesante estudiar el reclutamiento de la globalidad de las poblaciones celulares, o el impacto que la inflamación generada pueda generar en el establecimiento de la inmunidad adaptativa. Además, sería interesante evaluar los cambios a nivel del sitio de inoculación propiamente dicho. Asimismo, la redundancia del sistema inmune permite inferir que la sinergia entre el leve aumento de las distintas poblaciones celulares podría resultar en una respuesta inmune adaptativa más robusta y duradera en el tiempo.

No obstante, es importante estudiar qué impacto tiene la inmunomodulación evidenciada. Para ello es importante identificar cómo estos SBAs interaccionan con las células del sistema inmune innato, así como también identificar qué funcionalidades tienen o adquieren las células que son activadas. En este sentido, a continuación se muestran los resultados del estudio de la funcionalidad de células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y BMDCs al ser estimuladas por los SBAs. Más adelante se muestran los resultados de estudios de la interacción de estos SBAs con receptores innatos y con el mediador intracelular MyD88, así como también la implicancia de estos adyuvantes en la activación del complejo inflamasoma.

4.2.2. Activación y “funcionalidad” de APCs

Las células presentadoras de antígeno (APC) son componentes fundamentales del sistema inmune, ya que pueden reconocer, procesar y presentar antígenos extracelulares (en el contexto

de MHC-II) o intracelulares (en el contexto de MHC-I) a las células T antígeno-específicas. No obstante, para lograr la activación de las células T, además de la interacción MHC-TCR antígeno-específico, debe ocurrir la unión de receptores de las células T (tales como CD40L o CD28), a las moléculas co-estimuladoras de las APCs (CD40 o CD80/CD86 respectivamente). En particular, la activación de CD40 en las APCs induce la expresión de otras moléculas co-estimuladoras y promueve la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias^{317,318}. Los macrófagos constituyen una gran proporción de las APCs que expresan CD80/CD86, y por lo tanto, juegan un rol fundamental en la activación de células T, y por consiguiente en la inmunidad adaptativa.

4.2.2.1. Activación funcionalidad de macrófagos

Para estudiar la activación y funcionalidad de los macrófagos se realizaron estimulaciones *in vitro* con los SBAs, tanto de las saponinas solubles o en NPs tipo ISCOMATRIX, en la línea celular de macrófagos murinos J774 A.1 (ATCC).

Al evaluar la expresión de moléculas co-estimuladoras MHC-II, CD40, CD80 y CD86, mediante citometría de flujo en macrófagos estimulados con los diferentes SBAs de *Q. brasiliensis* o de QuilA®, no se encontraron diferencias en los porcentajes de células que mostraban expresión de los mismos (Fig. 28A-D), ni en los niveles de expresión de CD40 (Fig. 28E), MHC-II (Fig. 28F), ni CD80 (Fig. 28G) respecto al control negativo. Los macrófagos estimulados con QB80 o sus IMX mostraron mayores niveles de expresión de CD86, al igual que los estimulados con QuilA® (Fig. 28H), respecto al control negativo. Este resultado indicaría que *in vitro* los adyuvantes, ya sea formulados con QuilA® o con la fracción o QB80, de forma soluble o en NPs tipo ISCOMATRIX, logran inducir la sobreexpresión de sólo una de las moléculas co-estimuladoras estudiadas.

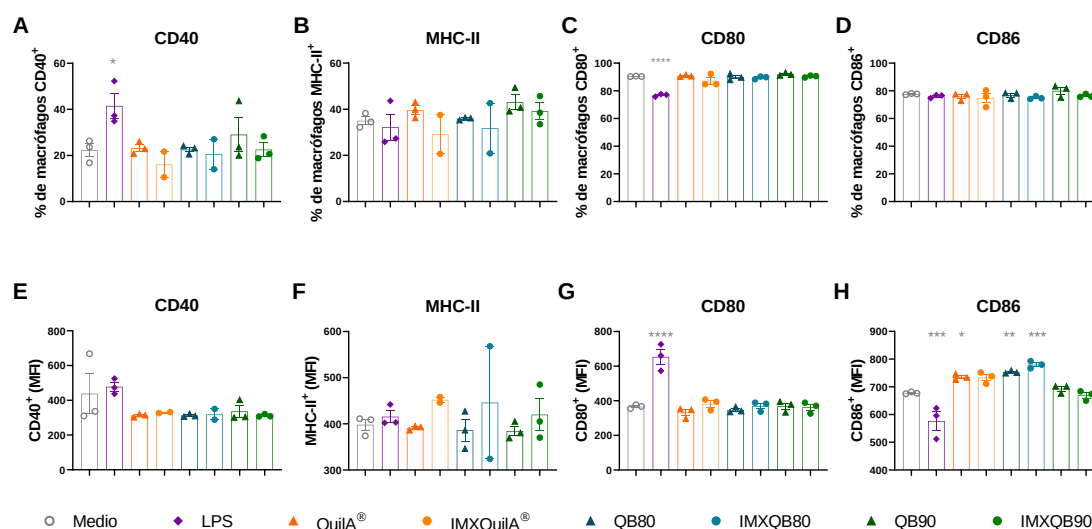


Figura 28. Expresión de moléculas co-estimuladoras en Macrófagos J774 A.1. Las células fueron estimuladas con 1 µg/mL de los distintos SBAs durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Como control positivo se estimularon células con 0,1 µg/mL de LPS, y como control negativo se utilizaron células sin estimular ("Medio"). Luego, se realizaron tinciones de superficie con dos paneles de anticuerpos de citometría: por un lado CD80-FITC y CD86-PE y por otro CD40-FITC y MHC II-PE, para evaluar la expresión de estas moléculas co-estimuladoras. Se muestra el porcentaje de células positivas para CD40 (A), MHC-II (B), CD80 (C) y CD86 (D), y también la media de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células positivas para cada fluoróforo (E-H). Los datos se expresan como la media ± SEM (n=3). Los grupos se compararon mediante One-way ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Dunnett contra el control negativo. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si p < 0,05. * indica p < 0,05; ** indica p < 0,01; *** indica p < 0,001; **** indica p < 0,0001.

Al estudiar la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos murinos J774 A.1 (ATCC) estimulados con los distintos SBAs, se evidenció que los macrófagos estimulados con las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* QB90 y QB80 eran capaces de producir una mayor concentración de IFN- γ e IL-10 que el control negativo, y de forma comparable a QuilA[®], pero no así sus nanoformulaciones tipo ISCOMATRIX (Fig. 29A&B). No se encontraron diferencias en la producción de IL-1 β e IL-18, y no se detectó la producción de IL-12p70 en las condiciones de este ensayo (datos no mostrados). Asimismo, se evaluó la producción de NO por parte de los macrófagos estimulados con los diferentes SBAs, y se detectó que los adyuvantes de QB90, tanto de forma soluble como en IMX, inducen la producción de NO en mayor medida que los macrófagos del control, y de forma similar a los adyuvantes producidos con QuilA[®] (Fig. 29C).

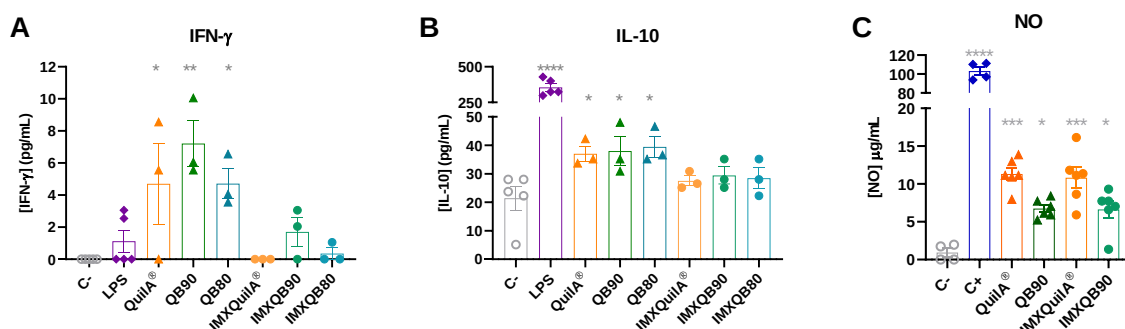


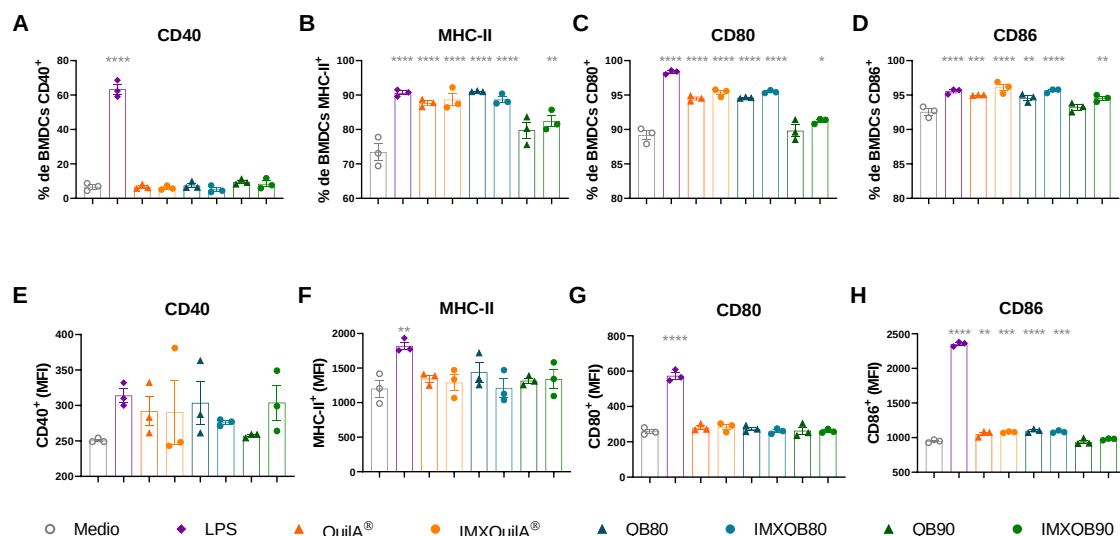
Figura 29. Concentración de citoquinas y óxido nítrico en sobrenadante de macrófagos murinos J774 A.1 estimulados con SBAs. Los macrófagos J774 A.1 fueron estimulados durante 24 horas a 37 °C y 5% CO₂ con 1 μ g/mL de QuilA[®], QB90, QB80 o sus IMX. Como control negativo se dejaron células sin estimular (cultivadas únicamente con medio de cultivo, “C-”), y como control positivo se estimularon células con 0,1 μ g/mL LPS (“LPS” en A y B) o 1 μ g/mL LPS y 100 U/mL de IFN- γ (“C+” en C). Se determinó la concentración de citoquinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) en los sobrenadantes de cultivo mediante kits de ELISA (Biolegend), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se determinó la concentración de óxido nítrico (NO) en los sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess (C). Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (n=3-5 para A y B; n = 4-6 para C). Los grupos se compararon contra el control negativo mediante la prueba t de Student. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si $p < 0,05$. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$.

4.2.2.2. Expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs

Además, se estudió la expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDCs estimuladas con los SBAs de *Q. brasiliensis* o QuilA[®], y aunque no se encontraron diferencias en el porcentaje de células que expresaban CD40 (Fig. 30A), se evidenció que los SBAs de *Q. brasiliensis* promovían la expresión MHC-II (Fig. 30B), CD80 (Fig. 30C) y CD86 (Fig. 30D) en un mayor porcentaje de células respecto al control negativo, de manera comparable a QuilA[®] o sus IMX. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de CD40 (Fig. 30E), MHC-II (Fig. 30F), ni CD80 (Fig. 30G) respecto al control. Sin embargo, se observó que QB80 de forma soluble o nanoparticulada, fue capaz de promover una mayor expresión de CD86 respecto al control, de manera comparable a QuilA[®] o sus IMX (Fig. 30H). La estimulación de las BMDCs con QB90 de forma soluble no fue capaz de promover una mayor expresión de las moléculas co-estimuladoras en ningún caso.

Este resultado concuerda parcialmente con los resultados presentados previamente de la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos, en donde los mayores cambios se evidenciaron en la expresión de CD86, pero además indica que *in vitro* los SBAs, ya sea

formulados con QuilA® o con la fracción QB80, y de forma soluble o en NPs tipo IMX o las IMX de QB90 inducen que un mayor número de células expresen moléculas co-estimuladoras y además aumentan la expresión de CD86, lo que podría contribuir a la capacidad adyuvante de estos componentes.



4.2.2.3. Internalización y procesamiento de antígeno por parte de BMDCs

Para estudiar los efectos de los SBAs sobre la captación y procesamiento antigénico por parte de BMDCs, se utilizó el antígeno OVA conjugado a la sonda DQ. Cuando este antígeno sufre el procesamiento proteolítico, por ejemplo, al ser procesado por las APC, la sonda con auto-quenching será clivada y emitirá fluorescencia en el canal de FITC, mientras que si dicho antígeno procesado es acumulado en el interior celular se formarán excímeros que emitirán fluorescencia en el canal de PE. De esta manera, es posible detectar el procesamiento y acumulación de este antígeno mediante citometría de flujo, visualizando la intensidad de fluorescencia en los canales de FITC y PE, y por lo tanto es posible determinar si los adyuvantes de interés promueven o no el procesamiento y acumulación de antígeno.

Para evaluar si los SBAs promovían la internalización y el procesamiento antigénico por parte de BMDCs, se procedió a estimular estas células con 2,5 µg/mL del antígeno DQ-OVA en conjunto con 0,625 µg/mL de fracciones de saponinas QB90, QB80 o QuilA®, ya sea de forma soluble o nanoparticulada (IMX). Se realizaron 3 condiciones de incubación: 15 minutos a 37 °C para evaluar la internalización y el procesamiento temprano, 24 horas a 37 °C para evaluar la internalización y el procesamiento tardío, y 24 horas a 4 °C como control de internalización pasiva o basal del ensayo.

Al estudiar el porcentaje de células positivas para FITC o PE, luego de la estimulación con los SBAs durante 24 horas a 37 °C, no se observan diferencias entre grupos en la internalización y procesamiento de antígeno (FITC⁺, Fig. 31A), pero se evidencia que la estimulación con QB80, QuilA[®] o con las formulaciones tipo IMX promovió una mayor acumulación de antígeno en el interior celular (PE⁺) que DQ-OVA sin adyuvante (Fig. 31B). Este resultado indica que estos adyuvantes promovieron la formación de exímeros del antígeno DQ-OVA en un mayor porcentaje de células que el control DQ-OVA, y por lo tanto que, en presencia de estos SBAs, las BMDCs son capaces de internalizar y procesar antígeno en mayor medida. No se observan diferencias entre grupos en las condiciones de estimulación basal (24 horas a 4 °C), ni a tiempos tempranos (15 minutos a 37 °C, datos no mostrados).

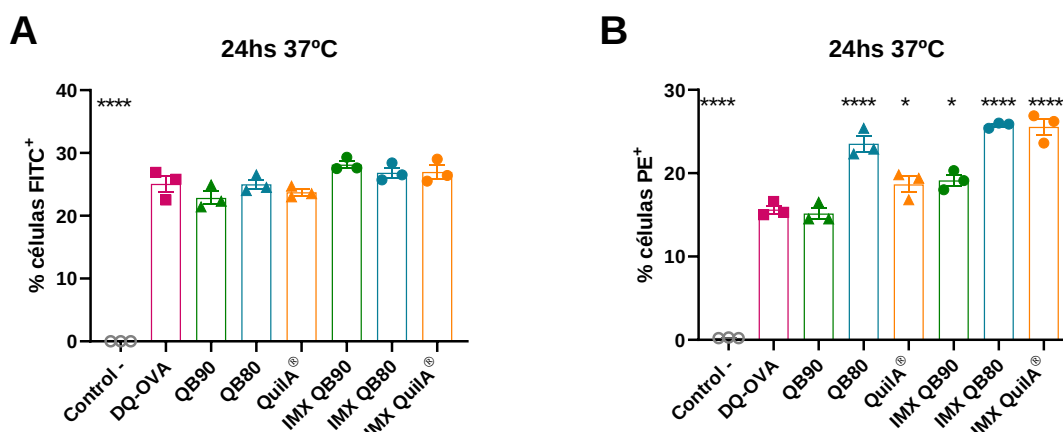


Figura 31. Porcentaje de BMDCs murinas que internalizan y procesan el antígeno DQ-OVA luego de 24 horas a 37 °C. Las BMDCs fueron estimuladas con DQ-OVA (barras fucsia) o con DQ-OVA y uno de los siguientes adyuvantes: fracciones de saponinas QuilA[®] (triángulos y barras naranjas), QB90 (triángulos y barras verdes), QB80 (triángulos y barras azules) o IMX formulados con estas fracciones: IMX QuilA[®] (círculos y barras naranjas), IMX QB90 (círculos y barras verdes), IMX QB80 (círculos y barras azules) durante 15 minutos a 37 °C, o durante 24 horas a 37 °C. Como control de la internalización y procesamiento basal, las células con los estímulos correspondientes se mantuvieron a 4 °C durante 24 hs. Se muestra el porcentaje de células expresando FITC⁺ (A) o PE⁺ (B), luego de ser incubadas con los SBAs durante 24 hs a 37 °C, sobre el total de células. Los datos se analizaron mediante One-way ANOVA y el post test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo contra el grupo estimulado con DQ-OVA. Se muestra el porcentaje de células ± SEM y los valores individuales (n=3). * indica $p < 0,05$; **** indica $p < 0,0001$.

Además, al observar la intensidad de fluorescencia de FITC y PE, se evidencia endocitosis pasiva mediada por el antígeno utilizado (a 4 °C, Fig. 32A&B). A tiempos tempranos (15 minutos a 37 °C) las SBAs no promueven la internalización, ni procesamiento del antígeno (Fig. 32C&D). Sin embargo, luego de 24 horas de incubación a 37 °C tampoco se observan diferencias en la internalización y procesamiento antigénico (FITC, Fig. 32E), pero sí se observa una mayor acumulación del antígeno en compartimentos endosomales en las BMDCs estimuladas con QB80, IMX QB80 e IMX QuilA[®] (PE, Fig. 32F).

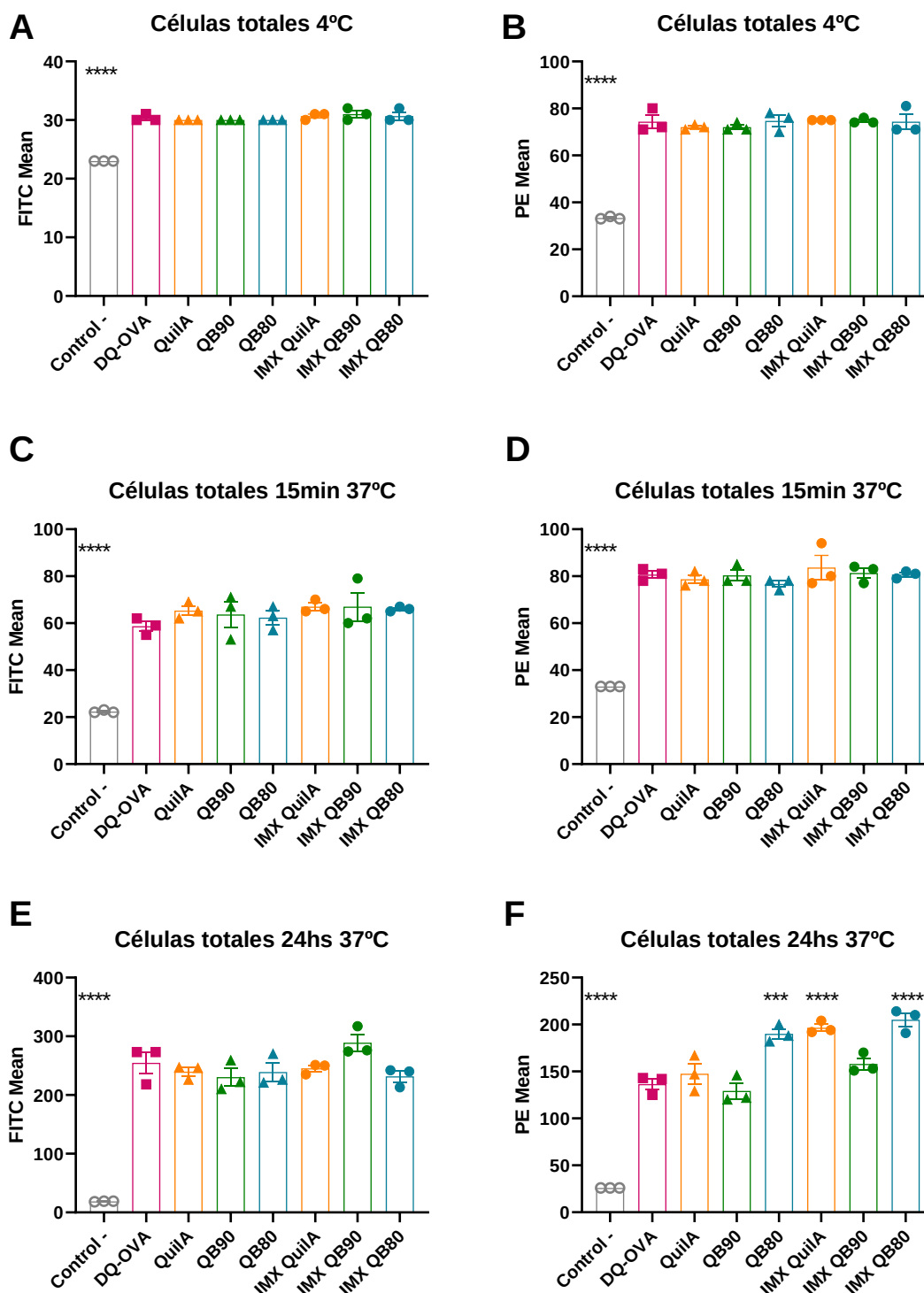


Figura 32. Internalización y procesamiento de antígeno por BMDCs murinas: intensidad de fluorescencia. Las BMDCs fueron estimuladas con DQ-OVA (barras fuscas) o con DQ-OVA y uno de los siguientes adyuvantes: fracciones de saponinas Quil A® (triángulos y barras naranjas), QB90 (triángulos y barras verdes), QB80 (triángulos y barras azules) o IMX formulados con estas fracciones: IMX QuilA® (círculos y barras naranjas), IMX QB90 (círculos y barras verdes), IMX QB80 (círculos y barras azules) durante 24 hs a 4 °C (A & B como control de la internalización y procesamiento basal) durante 15 minutos a 37 °C (C & D), o durante 24 horas a 37 °C (E & F). Los datos se analizaron mediante One-way ANOVA y el post test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo contra el grupo estimulado con DQ-OVA. Se muestra la media $\pm$ SEM ($n=3$) de la intensidad de fluorescencia para FITC (A, C & E) y PE (B, D & F). *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$.

Este resultado, en conjunto con el anterior es muy alentador, ya que indica que estos adyuvantes promueven que un mayor porcentaje de BMDCs procese e internalice el antígeno y, además, promueven mayor internalización y procesamiento antigénico por parte de éstas.

No obstante, no se observó aumento en la actividad para QB90, y en el caso de IMXQB90 el aumento no es tan pronunciado. Sin embargo, al analizar las citoquinas en sobrenadante de las BMDCs estimuladas con IMXQB90, se evidenció que estas eran capaces de producir las citoquinas proinflamatorias IL-1 α (Fig. 33A) y TNF- α (Fig. 33B) en mayor medida que las BMDCs estimuladas únicamente con DQ-OVA. Además, se detectó la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6 en cantidades comparables a la producción por las BMDCs estimuladas con DQ-OVA (Fig. 33C). También se detectó la producción de MCP-1 (Fig. 33D), e IFN- β (Fig. 33E), aunque en niveles comparables a las BMDCs sin estimular. En cambio, no se detectaron niveles de IL-23, IFN- γ , IL-12p70, IL-10, IL-27, IL-17a.

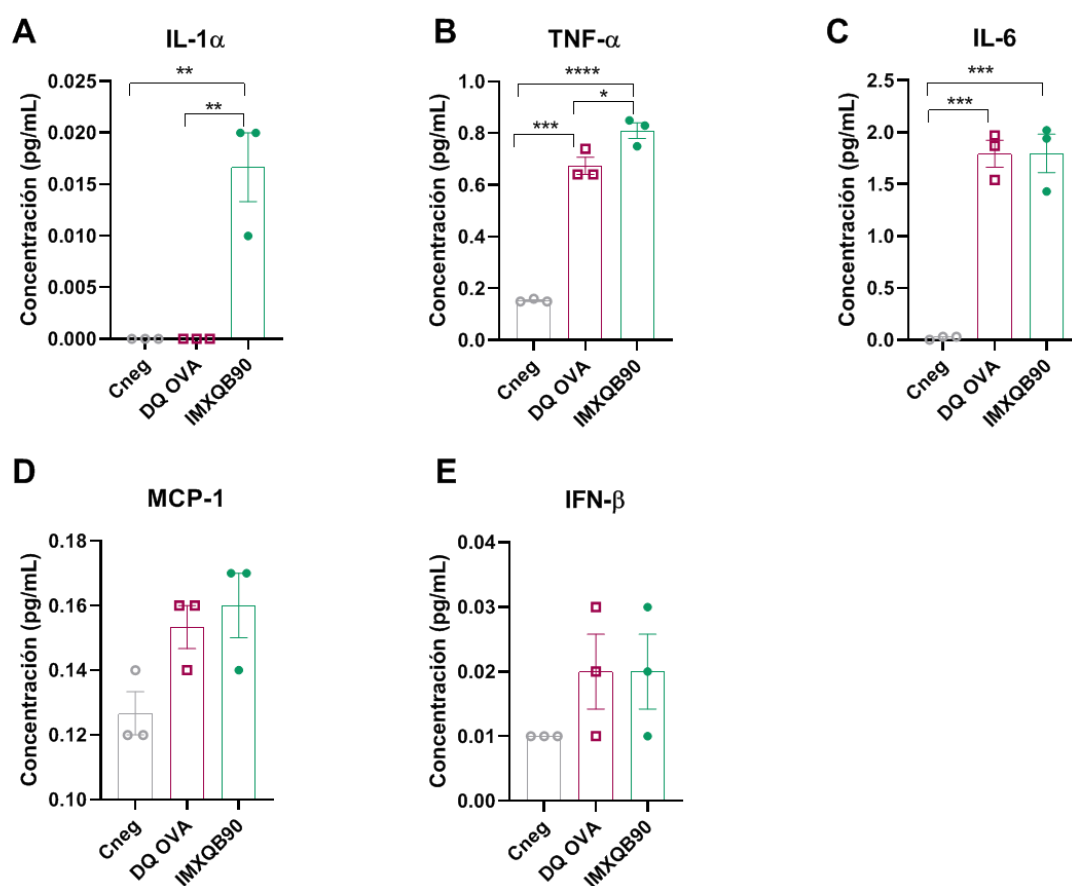


Figura 33. Concentración de citoquinas en sobrenadante de BMDCs murinas estimuladas con IMXQB90 y DQ-OVA.

Las BMDCs fueron estimuladas durante 24 horas a 37 °C y 5% CO₂ con 0,625 μ g/mL de IMXQB90 y 2,5 μ g/mL de DQ-OVA, o DQ-OVA sola. Como control negativo se dejaron células sin estimular (cultivadas únicamente con medio de cultivo, "Cneg"). Se determinó la concentración de citoquinas IL-1 α (A), TNF- α (B), IL-6 (C), MCP-1 (D), e IFN- β en los sobrenadantes de cultivo mediante citometría de flujo utilizando el kit LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex, Biolegend), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (n=3). Los grupos se compararon mediante la prueba t de Student. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si $p < 0,05$. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$.

4.2.3. Interacción de los SBAs con PRRs y MyD88

Dados los niveles de expresión de citoquinas observado en las APCs, y a la mayor actividad en la internalización y procesamiento antigénico por parte de las BMDCs, nos propusimos evaluar cómo los SBAs interactúan con estas células e inducen los cambios en la expresión de citoquinas y la funcionalidad diferencial (mayor procesamiento antigénico en BMDCs) descrita previamente. Para las saponinas de *Q. saponaria* se ha reportado que determinadas saponinas con ciertos sustituyentes de oligosacáridos podrían interactuar a través de la molécula DC-SIGN, promoviendo así su internalización a estas células. Esta interacción derivaría, sin embargo, en que los SBAs no puedan realizar la presentación cruzada de antígenos, y se estimule una respuesta de tipo Th2¹⁵⁹. Además, se ha reportado ampliamente que los SBAs de *Q. saponaria* que carecen de esos residuos oligosacáridicos son excelentes inmunoestimulantes, sin interactuar con los PRRs descritos hasta el momento, pero mediante una interacción que involucra a la molécula adaptadora clave: el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88)¹³⁷. Para evaluar si los SBAs de *Q. brasiliensis* señalizaban a través de PRR y MyD88, se utilizaron líneas celulares reporteras THP1-XBlue™, THP1-XBlue™ Myd Def y RAW-Blue™, según se detalla en Materiales & Métodos.

Al estimular estas células con 0,39 µg/mL de QB90 o IMXQB90, se evidenció que estos adyuvantes son agonistas de algún receptor de las células THP1-XBlue™ (la estimulación con QB90 e IMXQB90 mostró mayores niveles de actividad de la proteína codificada por el gen reportero que el control negativo) de forma dependiente de MyD88 (Fig. 34 B). Al estimular las células RAW-Blue™ con 1 µg/mL de QB80, QB90 o de la saponina comercial QuilA®, ya sea de forma soluble o en IMX, no se detectó actividad del producto del gen reportero, o se detectó muy baja actividad de éste (Fig. 34 A). De esta manera se puede concluir que ninguno de estos adyuvantes es agonista de los PRRs presentes en las células RAW-Blue™, al menos de forma directa. Quizás como los SBAs causan cierto daño celular, la liberación de DAMPs podrían producir la leve actividad del gen reportero detectada en las células RAW-Blue™ cuando fueron estimuladas con IMX (Fig. 34 A). La estimulación de las células por parte de los SBAs de *Q. brasiliensis* involucra algún receptor presente en las células THP1-XBlue™ pero no en las células RAW-Blue™, y es dependiente de la molécula adaptadora MyD88³⁰⁵. El TLR5 es un PRR presente en las células THP1-XBlue™ pero de muy baja expresión en las células RAW-Blue™. Aunque el agonista por excelencia de TLR5 es la flagelina³¹⁹, una proteína componente fundamental del flagelo bacteriano, recientemente se ha descrito que el dominio repetitivo CagY, un componente del sistema de secreción de tipo 4, de *Helicobacter pylori* también es agonista de este TLR³²⁰. Sin embargo, tanto flagelina como CagY son de naturaleza proteica, y por ende, muy diferentes a las saponinas o los IMXs que las contienen, por lo que, salvo que hubiera un epítipo estructural similar, esta interacción no parecería muy factible. También existen otros PRRs con muy baja expresión, y PRRs que aún no hemos elucidado, pero al igual que múltiples receptores conocidos, podrían señalar a través de MyD88.

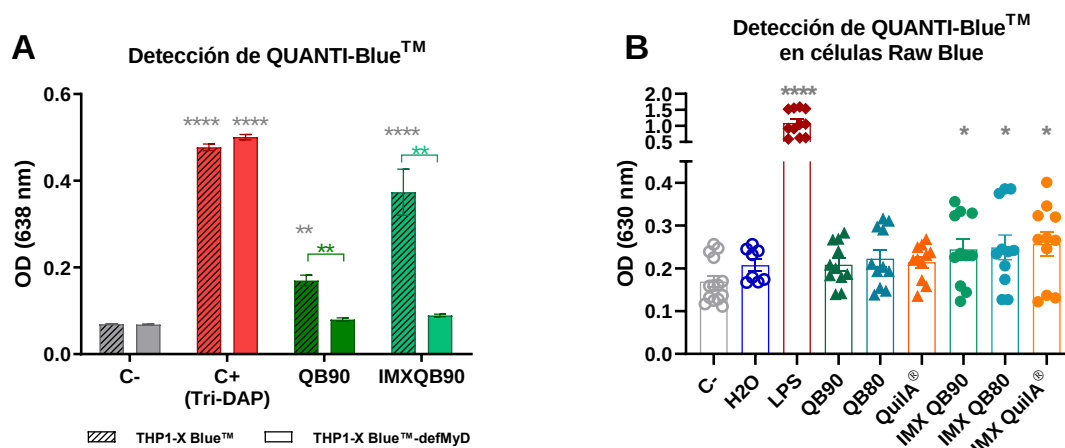


Figura 34. Células reporteras estimuladas con SBAs de *Q. brasiliensis*. A: Las células THP1-XBlue™ y THP1-XBlue™ - DefMyd fueron estimuladas con 0,39 µg/mL de QB90 en forma soluble o en IMX durante ON a 37°C y 5% CO₂. Los sobrenadantes de los cultivos fueron incubados junto con el sustrato QUANTI-Blue™ durante 1 hora, y se midió la absorbancia a 638 nm. Como control positivo se estimularon células con Tri-DAP (10 µg/mL, Invivogen®), y como control negativo con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (C-). Se muestra la media ± SEM, n=3. Los datos se compararon mediante Two-way ANOVA, y el test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar los grupos que recibieron los distintos estímulos respecto al control negativo, y mediante t-test para comparar entre grupos que recibieron el mismo estímulo, pero en células THP1-XBlue™ versus THP1-XBlue™ - DefMyd (asteriscos de colores). B: Las células RAW-Blue™ fueron estimuladas con 1 µg/mL de QB90, QB80, QuilA® en forma soluble o en IMX durante 24 hs a 37°C y 5% CO₂. Los sobrenadantes de los cultivos fueron incubados junto con el sustrato QUANTI-Blue™ durante 1 hora, y se midió la absorbancia a 630 nm. Como controles se incluyó el solvente de las fracciones de saponinas: H₂O apirógena; y como control positivo LPS (1 µg/mL, Sigma). Los datos corresponden a 3 experimentos independientes pooleados. Se muestra la media ± SEM, y los valores individuales (n=3-5 por experimento). Los datos se compararon contra el control negativo ("C-", células sin estimular) mediante one-way ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Dunnett. En A y B los datos se consideran estadísticamente significativos si p < 0,05. * indica p < 0,05; ** indica p < 0,01; *** indica p < 0,001; **** indica p < 0,0001. Los asteriscos grises corresponden a la comparación contra el control negativo (células sin estimular o en presencia de PBS). La figura B fue adaptada de Cibulski et. al. 2018³⁰⁵.

4.2.4. Producción de IL-1β dependiente de Casp1/11 y rol en la activación del inflammasoma

Dado que se ha reportado que los adyuvantes particulados, así como también QS-21 son capaces de activar el complejo inflammasoma NLRP3, nos propusimos estudiar si los SBAs de *Q. brasiliensis* son capaces de estimular estos complejos. Dado que la activación de éstos deriva en el clivaje de pro-IL-1β por parte de Caspasa 1, y la secreción al medio extracelular de IL-1β, nos propusimos evaluar si en presencia de una segunda señal de co-estimulación (LPS), estos SBAs eran capaces de producir IL-1β. Para ello se obtuvieron BMDCs de ratones cepa C57Bl/6J, y se estimularon durante 2 horas con LPS (10 ng/mL, Sigma), y luego con concentraciones crecientes de la fracción de saponinas QB90 o IMXQB90 (0,5; 2,5 y 10 µg/mL), y se determinó la concentración de IL-1β en los sobrenadantes de los cultivos. En presencia de LPS se detectó la producción de IL-1β en células estimuladas tanto con QB90 como con IMXQB90 (en concentraciones de 2,5 y 10 µg/mL), lo que sugiere que ambas formulaciones activarían las vías de los inflammasomas canónicos (Fig. 35A&C). Además, las células estimuladas con IMXQB90 produjeron cantidades de IL-1β comparables o mayores que en las células estimuladas con el control positivo (a pesar de estar éste en mayor concentración: 50 µg/mL (Fig. 35C). En ausencia de la segunda señal (LPS) QB90 no fue capaz de inducir la producción de IL-1β en ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 35B), pero se detectó que IMXQB90 sí fue capaz de hacerlo a

2,5 y 10 µg/mL. Es importante destacar que luego de la estimulación la viabilidad celular fue mayor o igual al 90 % en todos los casos (datos no mostrados).

Para entender si la producción de IL-1β inducida por QB90 e IMXQB90 era una consecuencia de la activación de las vías de los inflammasomas canónicos, se estimularon BMDCs derivadas de ratones C57Bl/6J *wild-type* (*wt*) y *knock-out* (*ko*) para las enzimas proteolíticas caspasa 1/11, con 10 µg/mL de estos adyuvantes. En presencia de LPS, ambas formulaciones lograron inducir la producción de IL-1β en BMDCs *wt*, pero no en BMDCs *ko* para caspasa 1/11 (Fig. 35E). No se encontraron diferencias en la estimulación en ausencia de LPS (Fig. 35F). Estos resultados indican que la producción de IL-1β inducida por QB90 o IMXQB90 es dependiente del eje caspasa 1/11 y, por lo tanto, ambas formulaciones serían capaces de activar las vías de los complejos inflammasomas. Estos resultados ya fueron reportados por nosotros³⁰⁵, y concuerdan con lo reportado previamente para ISCOMATRIX formulados con saponinas comerciales^{151,300}. No obstante, sería interesante determinar en el futuro cuál (o cuales) de los complejos inflammasomas canónicos estarían siendo activados por estos adyuvantes. Ha sido ampliamente reportado que la internalización de los adyuvantes particulados por DCs activan el inflammasoma NLRP3, y esta activación contribuye a su vez a desencadenar tanto una respuesta innata, como una antígeno-específica^{78,321}. Esta internalización de las partículas promueve el daño lisosomal, mientras que el aumento de la secreción de IL-1 β requiere de la acidificación del fagosoma, y de la cistein-proteasa lisosomal cathepsinaB, lo que sugiere un rol de el daño lisosomal en la activación del inflammasoma³²¹. Además, se ha reportado que aunque *in vitro* se requiera la presencia de un agonista de TLR (como LPS), la producción de IL-1β también se ha detectado en el sitio de inoculación de adyuvantes en ausencia de estos agonistas, lo que sugiere la existencia de factores endógenos capaces de actuar en sinergia con los adyuvantes particulados para promover la activación del inflammasoma³²¹.

Reportes previos estudiaron la activación del inflammasoma por parte de QS-21. Para ello estimularon BMDCs obtenidas de ratones *wt* y *ko* para NLRC4/IPAF o para la molécula adaptadora ASC con QS-21 y MPLA, y cuantificaron la producción de IL-1β en el sobrenadante de estos cultivos. Las BMDCs de los ratones *ko* para NLRC4/IPAF mostraron una producción de IL-1β similar a la de los ratones *wt*, sin embargo, no se detectó producción de esta citoquina en las BMDCs de los ratones *ko* para ASC³²². Esta molécula es fundamental para el ensamblado de algunos inflammasomas y para la activación autocatalítica de Caspasa 1, por lo que estos resultados estarían indicando que la producción de IL-1β se debe a la activación del complejo inflammasoma y al clivaje de pro-IL-1β por parte de Caspasa 1. Otros reportes han identificado que QS-21 es un potente activador del complejo inflammasoma NLRP3³²².

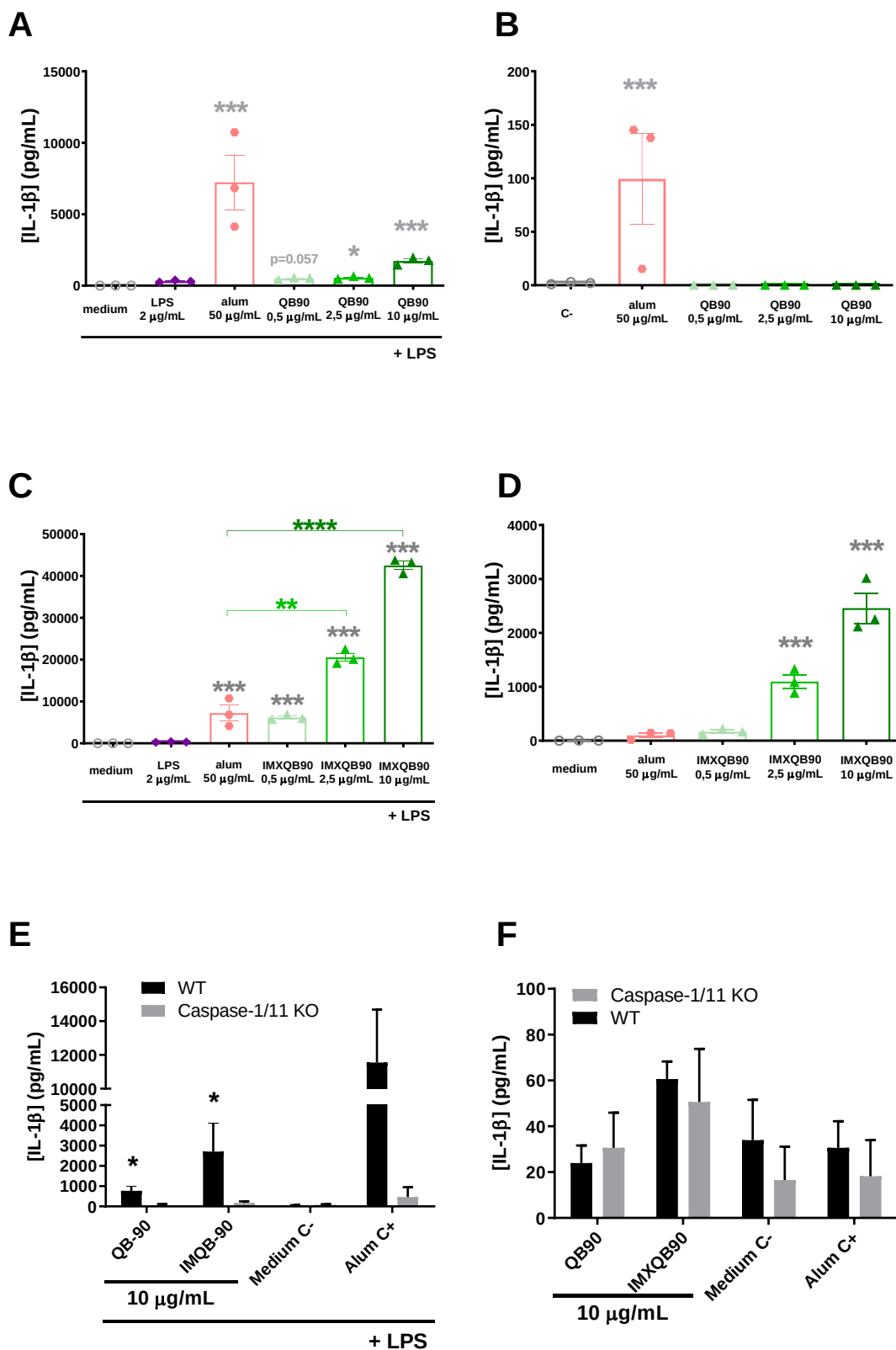


Figura 35. Producción de IL-1β en BMDCs murinas estimuladas con QB90 o IMXQB90. BMDCs obtenidas de ratones C57Bl/6 wt (A-D) fueron estimuladas durante 2 horas con (A&C) o sin (B&D) LPS (10 ng/mL, Sigma), y luego estimuladas durante 3 horas con 10; 2,5; y 0,5 µg/mL de QB90 (A&B) o IMXQB90 (C&D). BMDCs obtenidas de ratones C57Bl/6 wt y ko para Casp1/11 fueron estimulados durante 2 horas con (E) o sin (F) LPS (2 µg/mL, Sigma), y luego durante 3 horas con 10 µg/mL de QB90 o IMXQB90. Como control negativo se dejaron células sin estimular (cultivadas únicamente con medio de cultivo), y como control positivo se estimularon células con hidróxido de aluminio ("alum")

50 µg/mL, Alhydrogel, Sigma). La producción de IL-1β se midió en los sobrenadantes de los cultivos mediante un kit de ELISA (Biolegend), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los datos se expresan como la media ± SEM y son representativos de dos o más experimentos independientes. Los grupos se compararon contra el control negativo mediante la prueba t de Student. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si $p < 0,05$. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. La figura fue adaptada de Cibulski et. al. 2018³⁰⁵.

En este capítulo se abordó el estudio de la interacción de las saponinas de *Q. brasiliensis* de forma soluble o nanoparticulada con la inmunidad innata en modelo murino. Para ello, se estudió el reclutamiento de granulocitos y linfocitos a tiempos tempranos a nivel local y sistémico. Aunque no se detectaron grandes diferencias respecto al grupo control en poblaciones celulares específicas, se evidenció que estos SBAs son capaces de promover el reclutamiento de granulocitos y linfocitos al bazo y dLN, de forma comparable a las saponinas comerciales. Por primera vez se estudió y detectó la presencia de los macrófagos CD169⁺ al inocular estas saponinas. Sería interesante en el futuro, además, estudiar el reclutamiento celular a tiempos tempranos a nivel del sitio de inyección. Al estudiar la activación de las APCs tales como macrófagos y BMDCs, se detectó que los SBAs de *Q. brasiliensis* son capaces de promover la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40 y MHC-II principalmente en BMDCs, y además se detectó la producción de citoquinas proinflamatorias por ambas APCs, y de NO por parte de los macrófagos, indicando que los SBAs de *Q. brasiliensis* promueven la activación de estas células hacia un fenotipo proinflamatorio. Además, las BMDCs estimuladas con SBAs de *Q. brasiliensis* mostraron mayor capacidad de internalización y presentación de antígenos. Por último, se detectó que los adyuvantes de *Q. brasiliensis* promueven la producción de IL-1β en BMDCs de una manera dependiente de caspasa 1/11, sugiriendo que estos adyuvantes son capaces de activar el complejo inflammasoma, al igual que otros adyuvantes particulados.

No obstante, en este trabajo no se abordaron otros componentes o mecanismos del sistema inmune innato, tales como las implicancias del uso de estos SBAs sobre el sistema del complemento, o las modificaciones epigenéticas que pudieran generar, dando lugar a la generación de inmunidad entrenada (*trained immunity*), que desencadenara una respuesta inmune frente a un patógeno no relacionado con el antígeno vacunal, ampliando así el rango de protección conferido por estas sustancias.

Además, en este trabajo se abordaron mecanismos puntuales: reclutamiento de determinadas poblaciones celulares, expresión de moléculas de co-estimulación definidas, detección de determinadas citoquinas o metabolitos, etc. Sin embargo, el uso de las herramientas ómicas, tales como proteómica, transcriptómica, epigenómica, entre otras, permitiría un abordaje mas integral del estudio de los cambios sobre el sistema inmune innato inducido por los SBAs de *Q. brasiliensis*.

Por otra parte, es necesario destacar que en todos los experimentos realizados se detectaron algunos pocos cambios, o cambios sutiles respecto al control negativo. En este sentido se ha propuesto que aunque los efectores de la inmunidad innata son quienes activan a los efectores de la inmunidad adaptativa, lo que desencadena una potente respuesta por parte de estos últimos no es un mecanismo puntual en sí, sino que es la sinergia de múltiples mecanismos de acción que se activan sutilmente, gracias a la redundancia del sistema inmune, y de su fina regulación, lo que luego va a derivar en una respuesta adaptativa potente y duradera, que confiera protección por largo tiempo¹⁶⁰. Por esta razón, en el siguiente capítulo estudiamos el efecto de los SBAs sobre la inmunidad adaptativa en modelo murino, cuando estos adyuvantes son incluidos en diferentes vacunas experimentales.

4.3. Capítulo 3: Efecto de los SBAs sobre la inmunidad adaptativa

Para evaluar la capacidad adyuvante de las fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis*, tanto de forma soluble como en nanopartículas tipo ISCOMs, se realizaron ensayos de vacunación, y de vacunación y desafío en modelo murino, utilizando dos antígenos diferentes: uno parasitario y otro viral, ambos de interés para la salud humana o animal.

En primer lugar, se utilizó una leucinaminopeptidasa del parásito *Fasciola hepatica* (FhLAP), que es una metaloproteasa que el parásito exhibe en su estadio adulto, y podría ser crucial para la obtención de nutrientes a partir de la hemoglobina del hospedero²¹⁴, a la vez que ha demostrado ser un buen candidato vacunal²¹⁸.

Por otra parte, se utilizó antígenos del virus de influenza. Estos fueron obtenidos de dos vacunas comerciales trivalentes fraccionadas e inactivadas (TSIV, del inglés *Trivalent Split Inactivated Vaccines*) contra la gripe estacional humana: la vacuna producida por el Instituto Butantan (cepas 2016), y la vacuna Vaxigrip® (SANOFI Pasteur, cepas 2018). Es importante destacar que ambas vacunas contienen 30 µg/mL de HA por cepa, y ninguna contiene adyuvantes.

Con estos antígenos se formularon vacunas experimentales conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* ya sea en forma soluble o en nanopartículas tipo ISCOMs, y con ellas se procedió a realizar ensayos de vacunación, o vacunación y desafío en ratones, según los esquemas de vacunación que se indican en cada caso. Por un lado, se caracterizó la respuesta humoral y celular desencadenada. Por otro lado, se evaluó si la respuesta desencadenada era efectiva en conferir protección frente a la enfermedad.

4.3.1. Inmunidad adaptativa frente a un antígeno parasitario

Con el fin de evaluar la capacidad adyuvante de las saponinas de *Q. brasiliensis* y de sus nanoformulaciones en vacunas contra *F. hepatica*, se realizó un ensayo de vacunación en ratones hembra cepa CD1 (n=6), utilizando el antígeno proteico FhLAP y adyuvantes basados en Fb, tanto de forma soluble como en nanopartículas tipo ISCOMs (conteniendo distintas concentraciones de Fb y de FhLAP, según se indica en Materiales & Métodos). Además, como se mencionó previamente, un grupo de ratones se inoculó con una formulación conteniendo el antígeno junto la saponina comercial QuilA®, para comparar los resultados obtenidos con la fracción de saponinas nativas con una fracción de saponinas comerciales. En estos ensayos, se incluyeron como controles negativos un grupo inoculado con el antígeno sin adyuvantes ("FhLAP"), y un grupo con buffer TRIS. Los animales recibieron 3 dosis de la formulación correspondiente con 14 días de diferencia (día 0, 14 y 28), y un booster al día 70 según el esquema de la Figura 36A. A partir de este ensayo se evaluó la respuesta humoral y celular desencadenada.

4.3.1.1. Respuesta inmune humoral frente a un antígeno parasitario

Se evaluó la respuesta humoral mediante la determinación de la producción de anticuerpos específicos anti FhLAP en el suero de los animales vacunados por ELISA indirecto según se detalla en Materiales & Métodos. Todos los grupos inoculados con SBAs presentaron mayores niveles de anticuerpos IgGTotal que FhLAP a lo largo del tiempo (Fig. 36B-G), salvo el grupo inoculado con la saponina comercial QuilA® al d84 (Fig. 36G). En cuanto a los grupos inoculados con saponinas solubles, no se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos IgGTotal desencadenados entre los grupos inoculados con QuilA® y Fb, indicando que la saponina nativa Fb se comporta de forma similar a la saponina comercial QuilA®.

Respecto a las nanoformulaciones, a igual concentración de saponina, los ISCOMs de Fb generaron mayores niveles de anticuerpos IgGTotal que las saponinas solubles (QuilA® y Fb) al d14 y al d70. Por otro lado, no se observaron diferencias entre esta formulación (ISCOMs conteniendo 10 µg de Fb) con respecto a las nanopartículas conteniendo menor cantidad de Fb (ISCOMs 5), pero si con respecto a ISCOMs formulados con menos Fb y antígeno (ISCOM 5/2), ya que los ISCOMs (10) presentaron mayores niveles de IgGTotal a lo largo del tiempo (días 14, 28, 42 y 70).

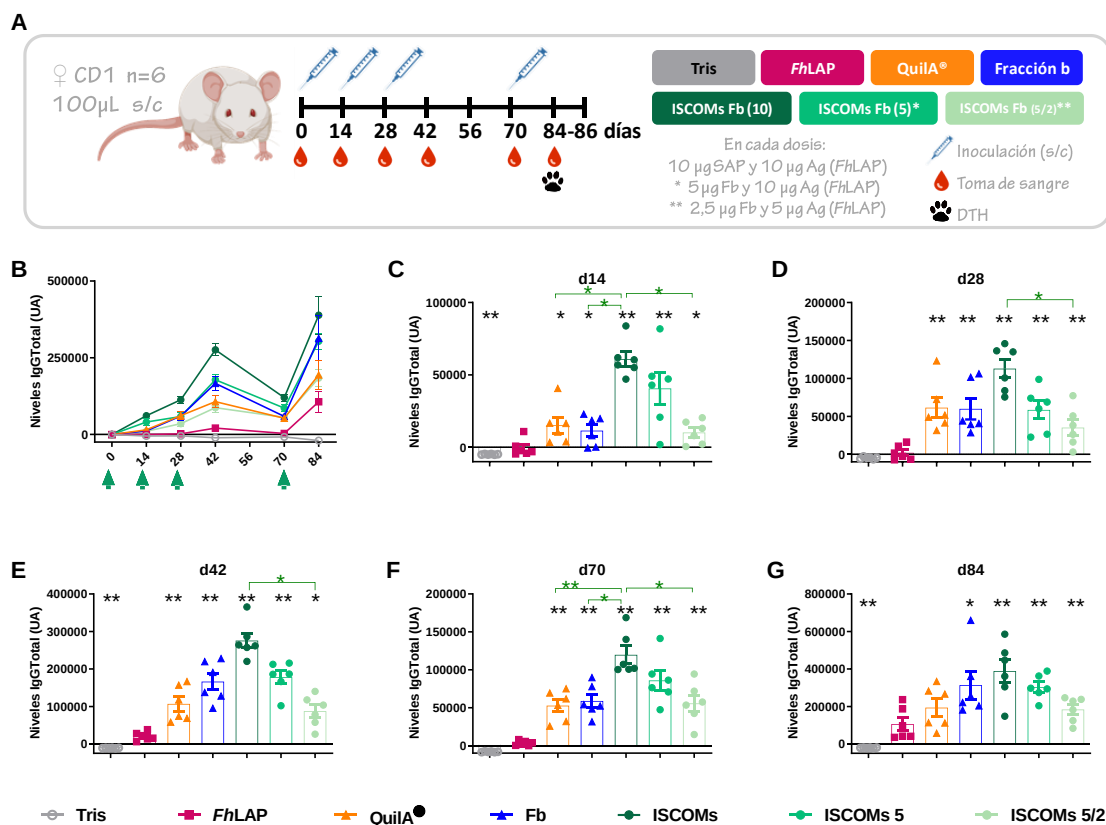


Figura 36. Ensayo de vacunación con FhLAP y niveles de anticuerpos IgGTotal. Esquema de vacunación (A). Los ratones hembra cepa CD1 recibieron 4 dosis (priming d0 y 3 boosters d14, d28 y d70) por vía s/c de una formulación conteniendo 10 µg/ds del antígeno FhLAP conteniendo como adyuvante ISCOMs de Fb (círculos verdes), Fb soluble (triángulos azules) o QuilA® (triángulos naranjas), a 10 µg/ds de saponinas, o sin adyuvante ("FhLAP", cuadrados fucsias). Como control se inoculó un grupo con buffer Tris ("Tris", círculos grises). El grupo "ISCOMs 5" fue inoculado con 5 µg/ds de saponinas y 10 µg/ds del antígeno FhLAP, mientras que el grupo "ISCOMs 5/2" contenía menor cantidad de saponinas y de antígeno por dosis (2,5 y 5 µg/ds respectivamente). Se muestra la cinética de los niveles de anticuerpos séricos específicos IgGTotal anti-FhLAP a lo largo de todo el ensayo (B), y el detalle del nivel de anticuerpos séricos IgGTotal anti-FhLAP al d14(C), d28 (D), d42 (E), d70 (F) y d84 (G) post priming. Se muestra el media ± SEM y los valores individuales (n=6/grupo). * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ mediante el test de Mann-Whitney. La comparación de cada grupo respecto al grupo "FhLAP" se indica en asteriscos negros, y la comparación entre grupos conteniendo SBAs se indica en asteriscos verdes.

Cuando se analizó la respuesta de las subclases IgG1 e IgG2b, se observó una cinética en los niveles de anticuerpos similar a la de IgGTotal, con un pico después de la tercera dosis del esquema primario, una posterior bajada al día 70, y un aumento significativo ante la dosis de refuerzo. Los animales inoculados con saponinas solubles QuilA® o Fb presentaron mayores niveles de IgG1 que FhLAP después de la segunda y tercera dosis (d28, Fig. 37B y d42, Fig. 37C).

No se encontraron diferencias en los niveles de IgG1 entre los grupos inoculados con QuilA® y Fb. Los animales inoculados con ISCOMs o ISCOMs 5 mostraron mayores niveles de anticuerpos IgG1 que los animales inoculados con *FhLAP* a los días 28 (Fig. 37B) y 42 (Fig. 37C), pero solo los animales inoculados con ISCOMs o QuilA® mostraron mayores niveles que *FhLAP* al d70 (Fig. 37D). El grupo inoculado con ISCOMs mostró además mayores niveles de IgG1 que los grupos inoculados con QuilA® y con ISCOMs 5/2 al d42 (Fig. 37C). Al d84, después del tercer *booster*, se observó un aumento de los niveles de IgG1 respecto al d70 en todos los grupos (Fig. 37A), aunque no se apreciaron diferencias entre los animales inoculados con SBAs y *FhLAP* (Fig. 37E). En lo que respecta a IgG2b, todos los animales inoculados con SBAs mostraron mayores niveles de IgG2b que *FhLAP* después de la segunda y tercera dosis (d28, Fig 37G, d42, Fig 37H, e incluso d70, Fig 37I). No se encontraron diferencias en los niveles de IgG2b entre los grupos inoculados con saponinas solubles. En los grupos inoculados con nanoformulaciones, el grupo inoculado con ISCOMs mostró mayores niveles de IgG2b que ISCOMs 5/2 al d28 (Fig 37G), y los grupos inoculados con ISCOMs e ISCOMs 5 mostraron mayores niveles de IgG2b que QuilA® al d42 (Fig 37H). Al igual que en el caso de IgG1, al d84 se observa un aumento de los niveles de IgG2b respecto al d70 (Fig 37F), pero no se encuentran diferencias entre los grupos inoculados con SBAs respecto al grupo inoculado con *FhLAP*. Es importante destacar que esta similitud al d84 entre los grupos que contenían adyuvante y el grupo *FhLAP*, tanto para el caso de IgG1 como para el de IgG2b, puede deberse a que en los animales inoculados con *FhLAP* ocurre un marcado incremento de los niveles de anticuerpos luego del tercer *booster*, y no porque se produzca una disminución en los niveles de anticuerpos de los grupos con adyuvantes.

Al estudiar la relación entre los niveles de anticuerpos IgG2b e IgG1, se observó que los animales inoculados con *FhLAP* presentaron una relación por debajo de 1 a lo largo del tiempo. Sin embargo, los animales inoculados con SBAs mostraron una relación IgG2b/IgG1 mayor o similar a 1 a lo largo de todo el ensayo (Fig. 37K), y significativamente mayor que la desencadenada en los animales vacunados sólo con *FhLAP* a los días 28, 42 y 70 (Fig. 37L-N). Al d84 la relación de los niveles de anticuerpos IgG2b/IgG1 fue similar entre grupos, aunque los animales inoculados con ISCOMs o con QuilA® soluble, continuaban mostrando una relación IgG2b/IgG1 mayor a 1 (Fig 37O).

Este resultado es muy alentador, ya que se ha reportado que la producción de anticuerpos IgG2b está mediada por TGF- β , IFN- γ e IL-2, citoquinas asociadas a una respuesta de perfil Th1^{323,324}, por lo que los adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* estarían desencadenando una potente respuesta humoral, polarizada hacia Th1, que es el fenotipo requerido para combatir la infección por el parásito *F. hepatica*^{225,325}.

Al observar la cinética de la relación IgG2b/IgG1 a lo largo del tiempo, se observa que el grupo *FhLAP* produce más IgG1, mientras que los grupos conteniendo adyuvante muestran una respuesta hacia la producción de IgG2b, indicando que los SBAs de *Q. brasiliensis* logran polarizar la respuesta hacia el fenotipo Th1 rápidamente. Además, dicha polarización ocurre luego de la segunda dosis (d28) con SBAs y se mantiene en el tiempo, sin que se incremente aunque se administren más dosis (hasta 4). Por estas razones, se podría inferir que no sería necesario administrar tantas dosis, ya que con dos dosis se estaría logrando la polarización hacia el fenotipo Th1.

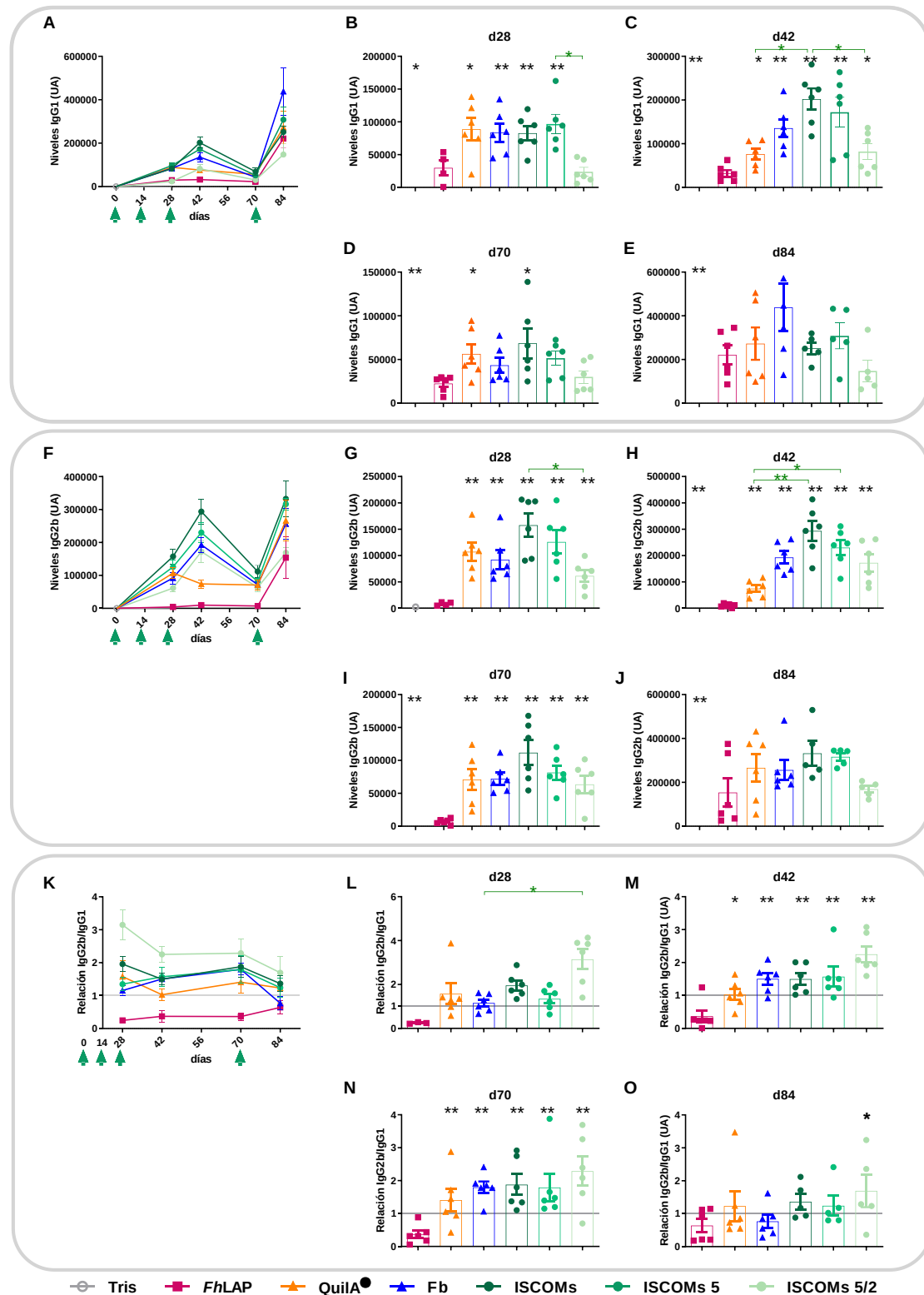


Figura 37. Perfil de la respuesta humoral desencadenada en el ensayo de vacunación con FhLAP. Se muestra la cinética de los niveles de IgG1 desencadenados a lo largo de todo el ensayo (A), y los niveles de IgG1 al d28 (B), d42 (C), d70 (D), y d84 (E) post priming. En F se muestra la cinética de los niveles de IgG2b desencadenados a lo largo de todo el ensayo, y los niveles de esta subclase al d28 (G), d42 (H), d70 (I), y d84 (J) post priming. En K se muestra la cinética de la relación de los niveles de IgG2b/IgG1, y el detalle de ésta relación al d28 (L), d42 (M), d70 (N) y d84 (O) post priming. Las flechas verdes en el eje x de las gráficas de cinética (A, F & K) representan las inoculaciones realizadas en el ensayo. Se muestra media $\pm$ SEM, y los valores individuales (n=6/grupo). * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$

mediante el test de Mann-Whitney. La comparación de cada grupo respecto al grupo “FhLAP” se indica en asteriscos negros, y la comparación entre grupos conteniendo SBAs se indica en asteriscos verdes.

4.3.1.2. Respuesta inmune celular frente al antígeno parasitario FhLAP

La medida de la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) es una herramienta que permite medir la respuesta mediada por células (CMI, del inglés *cellular-mediated immunity*) frente a un antígeno específico. Cuando ocurre la reacción de DTH, los macrófagos son reclutados al sitio de inoculación por DAMPs tales como HMGB1, (proteína de alta movilidad 1, del inglés: *high mobility group box 1*), ácido úrico, ATP (adenosin trifosfato) o HSP70 (proteínas de shock térmico de 70 kDa, del inglés *heat shock protein*). Allí internalizan, procesan y presentan el antígeno a células T (antígeno específicas) que fueron reclutadas de igual manera. Al reconocer al antígeno, las células T producen IFN- γ , que a su vez promoverá una cascada de citoquinas que activará a las células vasculares endoteliales locales. Esto promueve un rápido reclutamiento de neutrófilos y, subsecuentemente, de macrófagos y células T adicionales. Este infiltrado leucocitario provoca un disturbio en el tejido local, que resulta en el enrojecimiento y edema (inflamación) característicos de la reacción de DTH. Dado que esta reacción se basa en la capacidad de memoria de las células T que han sido previamente activadas, se utiliza para medir la respuesta de células T frente a un antígeno específico luego de la vacunación³²⁶.

Con el fin de estudiar si la vacunación con formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* eran capaces de desencadenar una reacción de DTH, 14 días después del tercer booster (d84) se inoculó a los animales con 1 μ g de FhLAP en la almohadilla de la pata derecha, y se midió la inflamación generada a las 24 horas. Como se muestra en la Figura 38A, no se observaron diferencias significativas entre la reacción de DTH desencadenada por los animales vacunados con formulaciones que contenían adyuvantes y los animales vacunados sólo con FhLAP, ni tampoco respecto al grupo control (TRIS).

Además, se estudió la linfoproliferación de esplenocitos obtenidos a tiempo final mediante citometría de flujo. Los esplenocitos fueron teñidos con CFSE, y estimulados con el antígeno vacunal FhLAP (1 μ g/mL) o con el mitógeno ConA (1 μ g/mL) durante 72 horas a 37 °C y 5% CO₂. Como control se cultivaron esplenocitos sin estimular (SE). Transcurridas las 72 horas los esplenocitos fueron marcados para identificar células T CD4⁺ y células T CD8⁺, y se calculó el índice de proliferación (IP) para cada subpoblación. No se observó linfoproliferación antígeno-específica (FhLAP/SE, IP = 1) para ambas poblaciones estudiadas (Fig. 38B&C). En cambio, sí se observó proliferación inespecífica (ConA/SE, IP > 1), pero en esta condición tampoco se observaron diferencias entre los grupos para los linfocitos T CD4⁺ ni T CD8⁺.

El hecho de que el IP de los esplenocitos estimulados con FhLAP/SE sea 1 indicaría que la cantidad de antígeno utilizada como estímulo *ex vivo* no fue suficiente para promover la linfoproliferación, o que la frecuencia de las células FhLAP específicas es muy baja, y como se está determinando sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ totales, la proliferación de los linfocitos específicos para el antígeno de interés se podría “perder” por la sensibilidad de la técnica. Este aspecto se podría optimizar utilizando tetrámeros (o multímeros) que permitan reconocer específicamente a aquellos linfocitos que hayan sido activados por epítopes del antígeno vacunal.

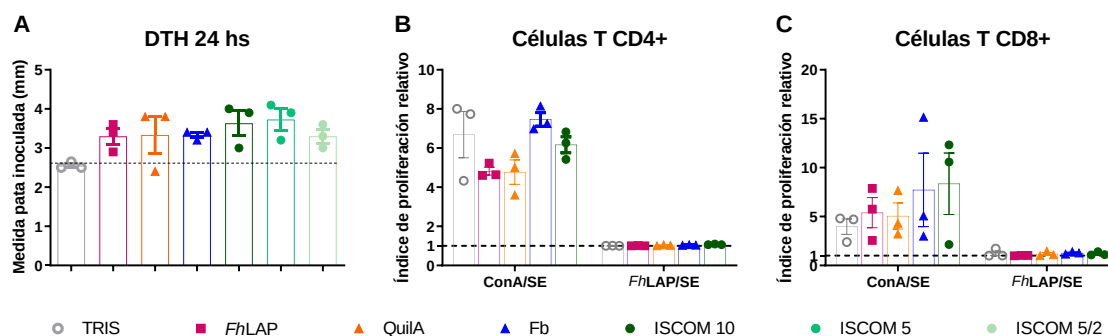


Figura 38. Respuesta celular frente a la vacunación. Al día 84 los animales fueron inoculados por vía i/d con 1 μ g de FhLAP en la almohadilla de la pata derecha, y se midió la inflamación generada a las 24 horas, para determinar la reacción de DTH (A). Al d86 los animales fueron sacrificados, y los esplenocitos asépticamente fueron teñidos con CFSE y estimulados con ConA, 0,5 μ g/mL de FhLAP o cultivados sin estimular (SE) durante 4 días. Luego se marcaron con anticuerpos de citometría anti-CD4-APC/Cy7 (Pharmingen) y anti-CD8-PE/Cy7 (BD), se seleccionaron los linfocitos por tamaño y granularidad, y se determinó el índice de proliferación de linfocitos T CD4⁺ (B) y T CD8⁺ (C) utilizando el programa ModFit. Se muestra media $\pm$ SEM, y los valores individuales ($n=3$).

No obstante, al estudiar la secreción de citoquinas en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados con FhLAP se encontró que los cultivos de los animales inoculados con ISCOMs (10 μ g/ds de Fb) o con saponinas solubles (Fb y QuilA[®]) produjeron altos niveles de IFN- γ (Fig. 39A, en el límite superior de detección de la técnica) y TNF- α (Fig. 39B), mayores que el grupo no vacunado (Tris). Además, el grupo inoculado con ISCOMs fue el único que mostró una mayor producción de IL-2 (Fig. 39C) así como también de IL-4 (Fig. 39D), respecto al control. Los grupos inoculados con saponinas nativas, ya sea en forma de ISCOMs o de forma soluble (Fb) fueron los únicos que mostraron mayor producción de IL-6 (Fig. 39E), IL-10 (Fig. 39F) e IL-17A (Fig. 39G) respecto al control, mientras que el grupo inoculado con la saponina comercial QuilA[®] no mostró diferencias respecto al control. Además, el grupo inoculado con ISCOMs fue el único que mostró mayor producción de IL-4, IL-10 e IL-17A que el grupo inoculado sólo con el antígeno FhLAP (Fig. 39 D, F y G, asteriscos negros). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente sobre el perfil de respuesta desencadenado por adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis*^{138,327}. Las diferencias encontradas en la secreción de citoquinas, reafirman la hipótesis de que utilizando tetrámeros (o multímeros) que permitan reconocer células T específicas se podría evidenciar la linfoproliferación antígeno-específica inducida por la vacunación.

La detección de altos niveles de citoquinas proinflamatorias asociadas a un perfil de respuesta de tipo Th1, tales como IFN- γ , TNF- α e IL-2, y en forma simultánea de citoquinas con perfil Th2 e inmunorreguladoras tales como IL-4, IL-6 e IL-10, y también de IL-17 en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inoculados con saponinas nativas indican que estos animales desencadenaron una respuesta mixta con perfil Th1/Th2/Th17, concordando con lo evidenciado al estudiar la respuesta humoral, donde se inducen tanto IgG1 como IgG2b.

En el caso de IL-10, se ha postulado que, si bien su producción se asocia a una regulación negativa de la respuesta, su producción también puede ser inducida directamente por ciertas citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ , como una forma de autorregular la respuesta inmune inducida con el fin de mantener la homeostasis y evitar la exacerbación de la respuesta y el aumento de la inmunopatología. En este sentido, se ha demostrado que IL-27 e IL-6 (cuya producción es amplificada por TGF- β) promueven la producción de IL-10 por parte de células

Tr1, Th1, Th2, Th17 y T CD8⁺ por un mecanismo dependiente de STAT-3 y STAT-1^{328,329}, y que IL-12 e IL-23 inducen la producción de IL-10 por parte de células T CD4⁺ y CD8⁺, sugiriendo que las citoquinas de la familia de IL-12 (IL-12, IL-23 e IL-27) tienen la capacidad de autorregularse. El hallazgo de que IL-12 e IL-23 promueven la producción de IL-10 por parte de las células T en una manera dosis-dependiente puede ser un mecanismo que explique cómo ocurre esta regulación³³⁰.

Por esta razón, se podría postular que dado que los animales inoculados con ISCOMs son los que producen más IL-10, pero a su vez muestran altos niveles de citoquinas proinflamatorias de fenotipo Th1, la producción de IL-10 en estos animales podría explicarse como forma de evitar el excesivo daño tisular por la potente respuesta Th1 que se está generando.

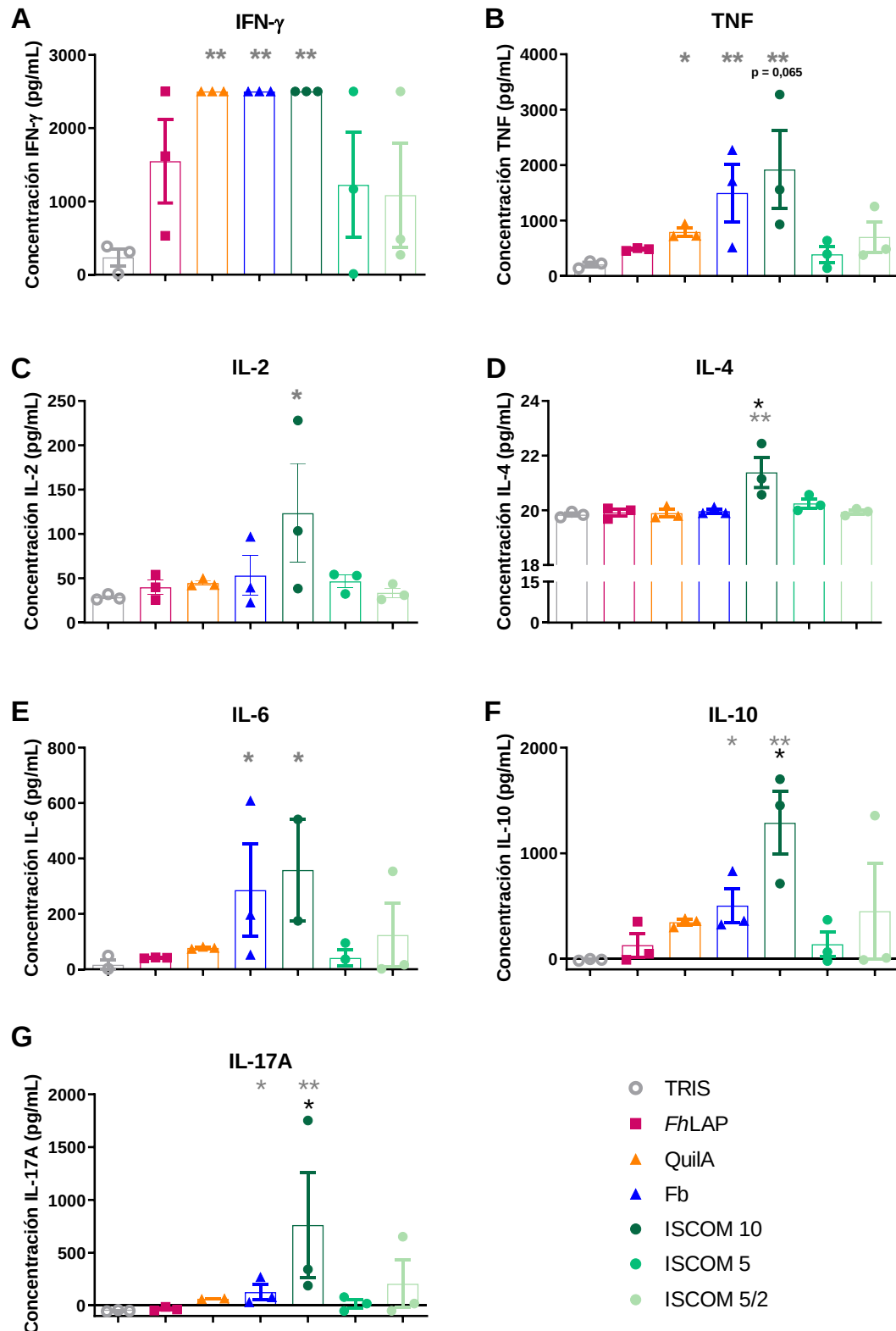


Figura 39. Citoquinas secretadas por esplenocitos. Se midió la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados estimulados ex vivo con 10 $\mu\text{g/mL}$ de FhLAP durante 72 horas. La concentración de las citoquinas IFN- γ (A), TNF (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F) e IL-17 (G) se determinó por citometría de flujo utilizando el kit CBA-mouse Th1/Th2/Th17 (BD), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las gráficas muestran los valores individuales, así como la media $\pm$ SEM ($n=3/\text{grupo}$). * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$.

0,01 mediante el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn sin corrección (comparación de cada grupo contra el grupo FhLAP se indica con asteriscos negros; comparación de cada grupo contra TRIS se indica en asteriscos grises).

F. hepatica ha co-evolucionado con sus múltiples hospederos y es capaz de modular al sistema inmune de éstos y así permanecer en ellos de forma asintomática³³¹. Estudios en bovinos han demostrado que animales que han estado expuestos al parásito generan una respuesta de anticuerpos IgG1 anti-*F. hepatica* que, aunque se produzcan en alto título, no logran resolver la infección. Es decir, la generación de una respuesta humoral de anticuerpos IgG1 se ha asociado a la generación de una respuesta de tipo Th2 no protectora frente a *F. hepatica*¹²⁻¹⁴, y se ha postulado que una respuesta de tipo Th1, como la desencadenada por los ISCOMs de Fb, sería la adecuada para conferir protección²²⁶.

Los resultados obtenidos demuestran que los SBAs de *Q. brasiliensis*, tanto de forma soluble (Fb), pero en particular en nanoformulaciones tipo ISCOMs son capaces de promover una buena respuesta humoral y celular. Para determinar si era posible desencadenar la misma respuesta con menos cantidad de saponinas o de antígeno por dosis, se evaluaron distintas nanoformulaciones ("ISCOMs 5" e "ISCOMs 5/2"). Los ISCOMs 5/2 no lograron desencadenar una respuesta comparable a ISCOMs ni a nivel humoral (ya que en muchos casos presentaban menores niveles de anticuerpos), ni a nivel celular, ya que no se detectó producción de citoquinas. La formulación ISCOMs 5 logró desencadenar una respuesta humoral comparable a la desencadenada por ISCOMs, pero no logró promover la secreción de las citoquinas estudiadas, cruciales para promover una respuesta Th1. Por ello, consideramos que la formulación más adecuada para continuar estudiando es la que incluye 10 µg de fracción de saponinas y 10 µg de antígeno FhLAP por dosis.

Aunque los resultados obtenidos son muy promisorios, el esquema de vacunación utilizado incluía cuatro dosis, y 3 de ellas con una frecuencia muy alta (cada 14 días). Considerando que las vacunas contra *F. hepatica* se aplicarían en animales de producción (ganado ovino, bovino y caprino), y que cada instancia de vacunación requiere inversión de recursos por parte del productor rural, sería interesante evaluar si las saponinas de *Q. brasiliensis* también son capaces de generar una potente respuesta inmune polarizada hacia el fenotipo Th1 cuando el esquema de vacunación incluyera menor cantidad de dosis con una mayor separación entre ellas. Estudios previos muestran que cuando se utilizó un esquema de dos dosis separadas por 28 días con una vacuna experimental formulada con el antígeno FhLAP y diferentes adyuvantes se obtuvieron buenos niveles de protección en conejos²¹⁸ y también en ovejas Corriedale²¹⁵.

4.3.1.3. Protección frente al parásito *F. hepatica*

Teniendo en cuenta los promisorios resultados obtenidos en el ensayo de vacunación contra *F. hepatica* en modelo murino, así como también el esquema de vacunación y desafío utilizado en vacunas experimentales conteniendo FhLAP en animales de producción^{215,218}, nos propusimos evaluar si la respuesta desencadenada por las formulaciones conteniendo adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* eran capaces de efectivamente conferir protección frente a este trematodo. Para ello se realizó un ensayo de vacunación y desafío en ratones hembras cepa CD1 utilizando el antígeno proteico FhLAP y SBAs nativas. En este ensayo incorporamos además la nueva formulación que hemos diseñado: un sistema de adyuvantes basado en saponinas de *Q. brasiliensis* y propóleos de *A. mellifera*, que consiste en partículas tipo ISCOMs con EEP de propóleos incorporados, y que hemos denominado ISCOMPro. Considerando los promisorios resultados obtenidos en el ensayo previo, en acuerdo con el grupo de trabajo (de amplia experiencia en trabajo con *F. hepatica*) y según lo reportado en la literatura^{218,219,332-334}, en este ensayo nos propusimos

vacunar a los ratones con un esquema con menor cantidad de dosis, que pueda ser más aplicable en un futuro en la actividad agropecuaria. El esquema, que ya fue utilizado inoculando el antígeno *FhLAP* en conejos²¹⁸ y ovejas²¹⁵, consistió en dos dosis separadas por 28 días, y el desafío 56 días después del *priming*, tal como se muestra en la Figura 40A. A partir de este ensayo se evaluó la respuesta humoral y celular desencadenada, y también la protección frente al desafío. Lamentablemente, al d42 se constató que en el grupo inoculado con la saponina soluble (QB80) había un ratón macho, y todas las hembras restantes estaban preñadas o ya habían parido crías. Por esta razón, se descartó el grupo inoculado con QB80 inicialmente, y de forma desfasada, se vacunó a nuevamente a un grupo con QB80 (compuesto únicamente por hembras). Junto a éste, se inoculó también a otro grupo control con *FhLAP* sin adyuvantes ("*FhLAP_{rep}*"), con el fin de comparar al grupo inoculado con la formulación conteniendo QB80 respecto a la formulación sin adyuvantes en condiciones similares.

En cuanto a la respuesta humoral desencadenada, se observó el pico de aumento de los niveles de anticuerpos a las dos semanas después de la segunda dosis al igual que en el ensayo anterior, aunque la misma fue más tenue y retardada. No obstante, todos los grupos inoculados con SBAs, ya sea de forma nanoparticulada (ISCOMs e ISCOMPro) como soluble (fracción QB80) mostraron niveles de anticuerpos mayores a los grupos inoculados sin adyuvantes (*FhLAP* y *FhLAP_{rep}* respectivamente).

Es importante destacar que los animales inoculados con ISCOMPro al igual que las saponinas nativas solubles lograron desarrollar mayores niveles de IgGTotal después de la primera dosis (Fig 40 B-D), y también después de la segunda dosis (Fig 40 E-F). No se observa un aumento de los niveles de anticuerpos IgGTotal después del desafío (d56 en comparación con el d101) en ninguno de los grupos inoculados (Fig 40B). Aunque el grupo *FhLAP* muestra una pendiente positiva, no hay diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos del d56 respecto a los niveles de d101 (Fig 40B).

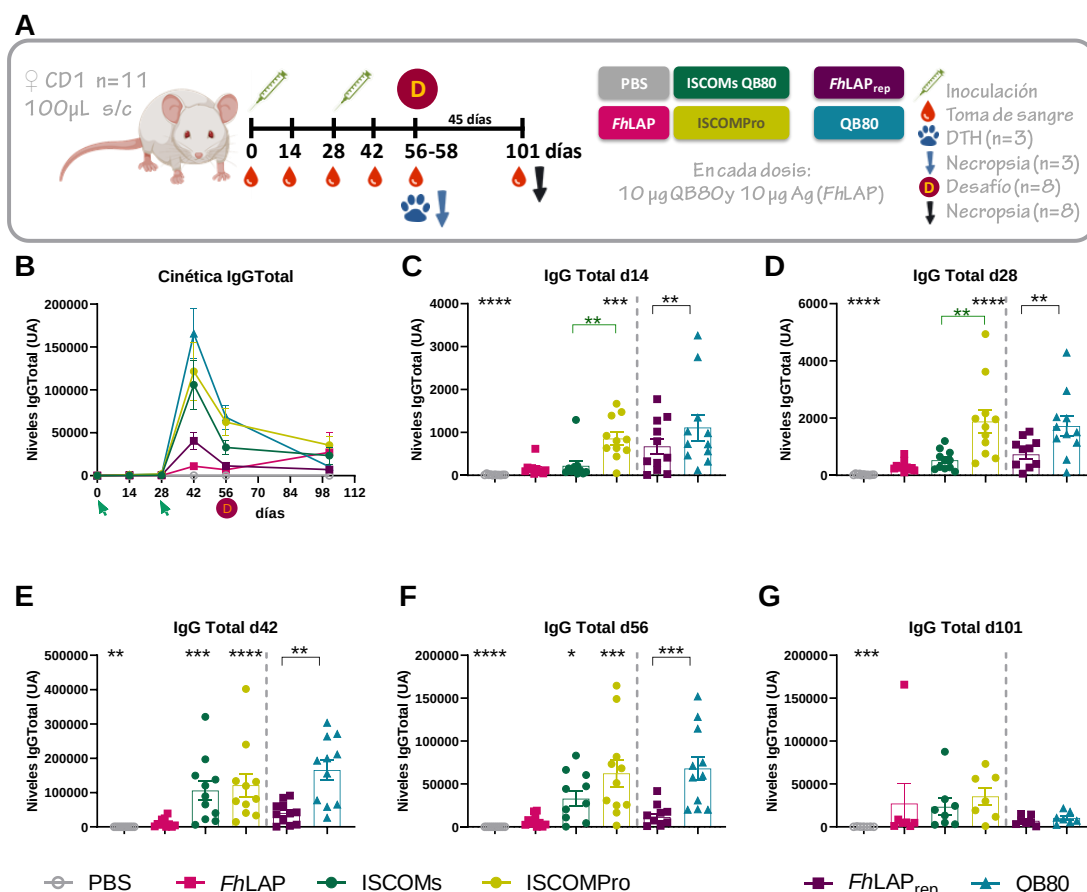


Figura 40. Ensayo de vacunación y desafío con *F. hepatica*: esquema de vacunación y niveles de anticuerpos IgGTotal. Esquema de vacunación (A). Los ratones hembra cepa CD1 recibieron 2 dosis (priming d0 y booster al d28) por vía s/c de una formulación conteniendo 10 µg/ds del antígeno FhLAP conteniendo como adyuvante ISCOMs de QB80 (círculos verdes), ISCOMPro de QB80 (círculos amarillos), QB80 soluble (triángulos celestes), que contengan 10 µg/ds de saponinas, o sin adyuvante ("FhLAP" cuadrados fucsias y "FhLAP_{rep}" cuadrados violetas). Como control negativo se inoculó un grupo con buffer PBS ("PBS", círculos vacíos grises). Al d56 los animales fueron inoculados para reacción de DTH (n=3), o fueron desafiados con 25-30 metacercarias (18 % de viabilidad) de *F. hepatica* por vía intragástrica (n=8). Los animales desafiados se monitorearon durante 45 días. Se muestra la cinética de los niveles de anticuerpos séricos específicos IgGTotal anti-FhLAP a lo largo de todo el ensayo (B), y el detalle del nivel de anticuerpos séricos IgGTotal anti-FhLAP al d14(C), d28 (D), d42 (E), d70 (F) y d84 (G) post priming. Las gráficas de barras muestran la media ± SEM (n=8-11/ grupo), así como los valores individuales. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$ mediante el test de Mann-Whitney. La comparación de cada grupo respecto al grupo "FhLAP" se indica en asteriscos negros, y la comparación entre grupos conteniendo SBAs se indica en asteriscos verdes. Los grupos PBS, ISCOMs e ISCOMPro se compararon contra "FhLAP", y el grupo inoculado con QB80 se comparó contra "FhLAP_{rep}".

Al evaluar el perfil de la respuesta humoral desencadenada, las formulaciones conteniendo adyuvantes basados en *Q. brasiliensis* muestran buenos niveles de IgG1 (Fig. 41 A-F) e IgG2b (Fig. 41G-L), aunque sólo el grupo inoculado con ISCOMPro muestra mayores niveles de ambos isotipos que el control sin adyuvante (FhLAP) a lo largo de todo el ensayo, y el grupo inoculado con QB80 muestra mayores niveles de IgG2b, pero no de IgG1 respecto al control (FhLAP_{rep}). No se observa un aumento de los niveles de anticuerpos IgG1 ni IgG2b después del desafío (d56 en comparación con el d101) en ninguno de los grupos inoculados (Fig 41 A&G). Aunque en el caso de IgG1 el grupo FhLAP muestra una pendiente positiva, no hay diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos del d56 respecto a los niveles de d101. Esto indicaría que el desafío no provocó un re-

estímulo de la respuesta desencadenada por la vacunación, o al menos no un re-estímulo tal que pueda ser detectado en los niveles de anticuerpos circulantes. Quizás el antígeno utilizado en la vacunación esté subrepresentado y por lo tanto no logra re-estimular al sistema inmune y desencadenar la respuesta correspondiente. Otra posibilidad es que se haya producido un aumento en los niveles de anticuerpos, pero que éstos estén actuando, por lo que no pueden ser detectados en el ELISA. Por último y no menos importante, la medida post desafío se realizó 45 días después del mismo (d101 del ensayo), por lo que quizás el aumento de niveles de anticuerpos ocurrió, pero al d101 ya no eran detectables.

Por otra parte, a diferencia del ensayo anterior, los únicos animales que desarrollaron una relación del nivel de anticuerpos IgG2b/IgG1 mayor a 1 son los inoculados con QB80, pero no los inoculados con nanoformulaciones (Fig. 41M). Este cambio en el perfil de la respuesta podría explicarse por la menor cantidad de dosis administradas a los animales, y la mayor separación entre ambas. Además, la fracción de saponinas nativas utilizada en este ensayo fue QB80, mientras que en el ensayo anterior se utilizó Fb.

Veintiocho días después del booster (d56) se realizó un ensayo de DTH ($n=3$) para evaluar la respuesta celular desencadenada. Dado que los animales presentaban diferencias en el espesor de sus patas previo a la inoculación intradérmica del antígeno, el análisis de la reacción de DTH desencadenada se realizó restando el espesor inicial al espesor luego de 24 horas de la inoculación intradérmica (espesor DTH = espesor 24hs – espesor inicial). No se encontraron diferencias entre los grupos (Fig 41N). Este resultado es consistente con el resultado de DTH obtenido previamente en el ensayo de vacunación contra *F. hepatica*, donde tampoco se encontraron diferencias entre grupos en el desarrollo de una reacción de DTH (Fig. 38A). No obstante, es importante considerar que en ambos ensayos los animales inoculados con nanoformulaciones muestran una tendencia a desarrollar mayor reacción de DTH, y que en ambos casos se utilizó un número de animales muy pequeño ($n=3$), y que la cepa de ratones utilizada (CD1) corresponde a ratones exocriados, lo que aumenta la variabilidad de los resultados. Quizás si se aumentara el n de los grupos y si se utilizaran ratones endocriados, se podrían encontrar diferencias significativas entre los grupos.

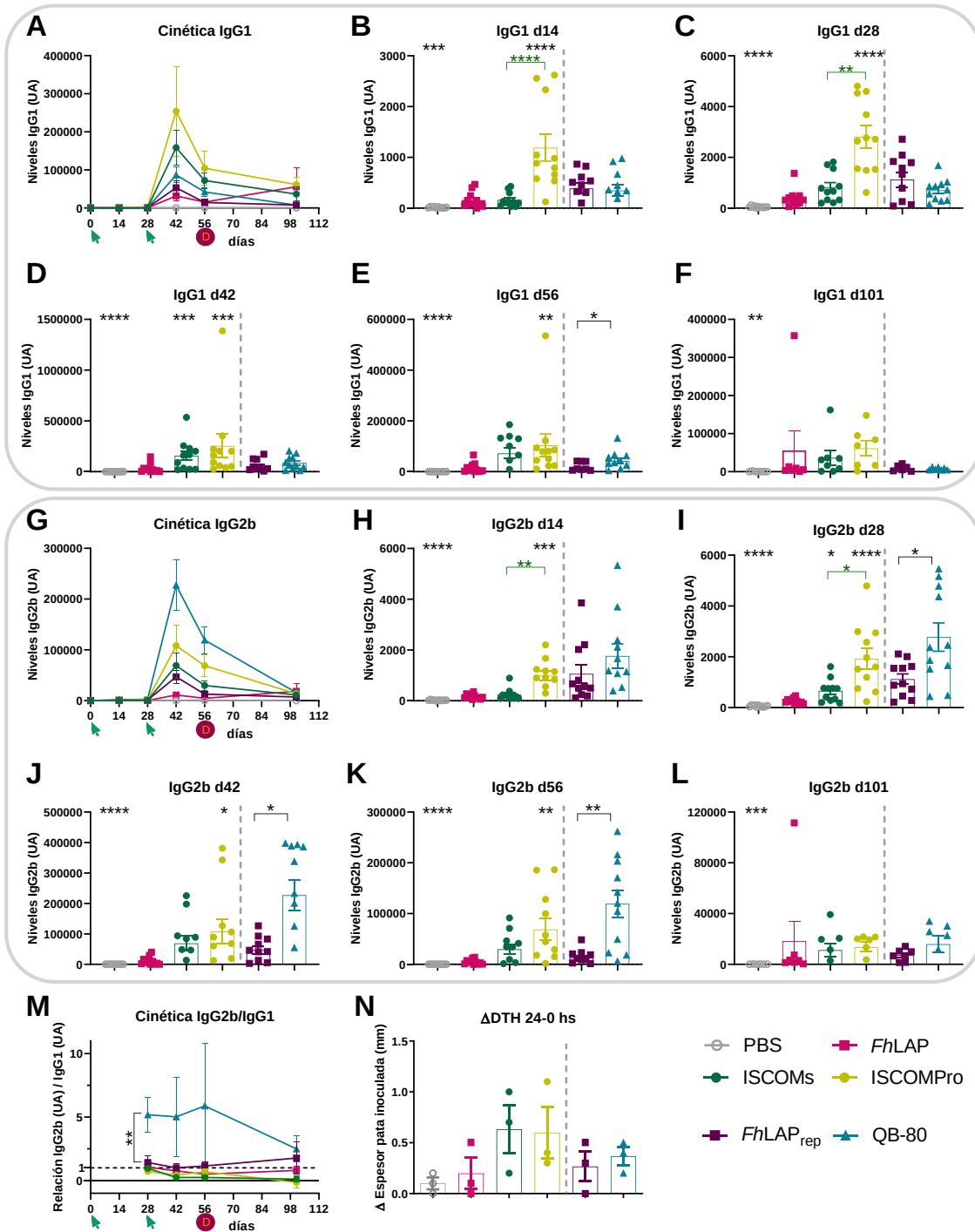


Figura 41. Perfil de la respuesta humoral y respuesta celular desencadenada en el ensayo de vacunación y desafío contra *F. hepatica*. Se muestra la cinética de los niveles de IgG1 desencadenados a lo largo de todo el ensayo (A), y los niveles de IgG1 al d14 (B), d28 (C), d42 (D), d56 (E) y d101 (F) post priming. En G se muestra la cinética de los niveles de IgG2b desencadenados a lo largo de todo el ensayo, y los niveles de esta subclase al d14 (H), d28 (I), d42 (J), d56 (K), y d101 (L) post priming. En M se muestra la cinética de la relación de los niveles de IgG2b/IgG1 a lo largo de todo el ensayo. Las flechas verdes en el eje x de las gráficas de cinética (A, G & M) representan las inoculaciones realizadas en el ensayo. Al d56 post priming se realizó un ensayo de DTH (n=3). La reacción desencadenada se calculó como: espesor DTH = espesor 24hs – espesor inicial, y el resultado se muestra en N. Las gráficas de barras muestran la media $\pm$ SEM. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$ mediante el test de Mann-Whitney. La comparación de cada grupo respecto al grupo “FhLAP” se indica en asteriscos negros, y la comparación entre grupos conteniendo SBAs se indica en asteriscos verdes. Los grupos PBS, ISCOMs e ISCOMPro se compararon contra “FhLAP”, y el grupo inoculado con QB-80 se comparó contra “FhLAP_{rep}”.

En colaboración con la Unidad de Biología Parasitaria (UBP) del Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Udelar, se procedió a evaluar la protección frente a un desafío. Para ello, 56 días después del *priming*, los animales fueron desafiados (n=8) con 25-30 metacercarias de *F. hepatica* (18 % de viabilidad) por vía intragástrica. Los animales se monitorearon durante 45 días, teniendo en cuenta el peso corporal, desarrollo de signos clínicos de la enfermedad (piloerección, movilidad, ascitis, estado general, peso corporal) y sobrevida.

Los grupos no mostraron diferencias en la variación del peso respecto al momento previo al desafío (Fig. 42A). Tampoco se encontraron diferencias entre grupos en la sobrevida, muriendo 1 o 2 animales entre los días 21- 34 post-desafío en cada grupo (Fig. 42B).

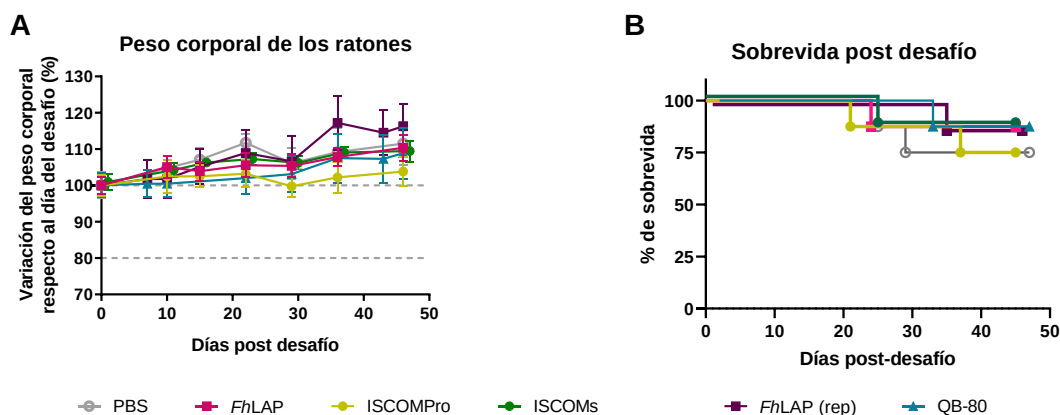


Figura 42. Ensayo de desafío con *F. hepatica*. Al día 56 post-*priming* los animales (n=8) fueron desafiados por vía intragástrica con 25-30 metacercarias de *F. hepatica* (18 % de viabilidad). Los animales se monitorearon durante 45 días para evaluar desarrollo de signos clínicos de la enfermedad (piloerección, movilidad, ascitis, estado general, peso corporal) y sobrevida. El peso corporal se evaluó semanalmente. Porcentaje de variación del peso corporal de los ratones luego del desafío, respecto a la media de cada grupo previo al desafío (A) y sobrevida de los animales desafiados (B).

Transcurridos 45 días del desafío, se procedió a la necropsia de los animales, y se estudió el desarrollo de esplenomegalia y hepatomegalia, el ancho del peritoneo, la recuperación de tremátodos en estado adulto, y se estableció un *score* para cuantificar el daño hepático (en cada lóbulo y global). No se encontraron diferencias en el ancho del peritoneo (Fig. 43A), ni en el desarrollo de hepatomegalia (Fig. 43B&C) entre grupos. Aunque tampoco se encontraron diferencias entre grupos en el peso del bazo (Fig. 43D), se encontró que el grupo inoculado con ISCOMs presentaba mayor área del bazo que el grupo inoculado con ISCOMPro (Fig. 43E). No obstante, no se encontraron diferencias en la recuperación de tremátodos en estado adulto entre los grupos (Fig. 43F). Es importante destacar que el ratón no es un modelo óptimo para infecciones por *F. hepatica*, ya que, si bien puede ser infectado por este tremátodo, éste no logra desarrollarse completamente debido al tamaño pequeño de su hospedero. Por esta razón, los individuos de *Fasciola* alcanzan su estado adulto, pero reducen su tamaño para adaptarse al tamaño del huésped (Fig. 43G). Además, los tremátodos adultos fueron encontrados no solo en el hígado o vesícula biliar, sino también en el peritoneo, por fuera del intestino y en el duodeno. Aunque la fasciolosis ectópica no es frecuente, en humanos se ha reportado que durante la etapa aguda de la infección el tremátodo adulto puede alcanzar otros tejidos y órganos, ya sean dentro de la cavidad peritoneal, o ganglios, espina dorsal, incluso el ojo y el cerebro, aunque no está claro por qué sucede ni por qué vías³³⁵.

Respecto al daño hepático, si bien los animales inoculados con FhLAP (sin adyuvante) también mostraron un menor daño hepático que los animales control (PBS), en los animales inoculados

con ISCOMPro esta reducción en el daño hepático fue más pronunciada (Fig. 43H), sugiriendo el potencial de esta nueva formulación frente a las otras formulaciones conteniendo SBAs.

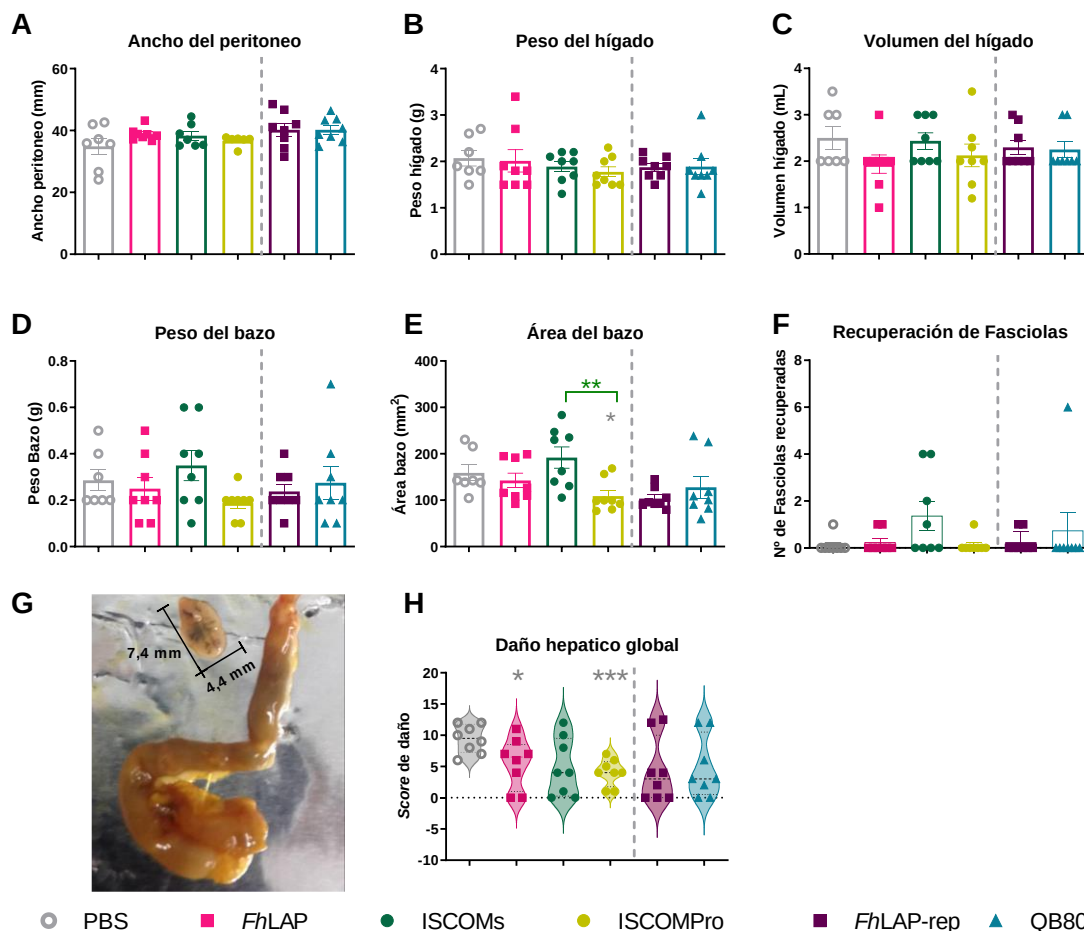


Figura 43. Ensayo de desafío con *F. hepatica*: necropsia a tiempo final, 45 días post desafío (dpd). Se muestra el ancho del peritoneo (A). Para determinar la hepatomegalia se midió el peso (B) y el volumen (C) del hígado. Para determinar la esplenomegalia se determinó el área (D) y el peso (E) del bazo. Cantidad de fasciolas adultas recuperadas (F). La foto de G corresponde a una fasciola ectópica encontrada en la cavidad peritoneal afuera del intestino (ratón G2R6), y se indica el tamaño de la misma. Determinación del daño hepático a nivel global (H). * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, y *** indica $p < 0,001$, mediante Mann-Whitney (cada grupo contra el grupo "PBS" se indica con asteriscos grises; en caso de diferencias entre otros grupos se indica con barras horizontales y asteriscos de colores).

La respuesta inmune desencadenada por las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* fue potente y robusta, aun cuando hubo una gran variabilidad entre los dos ensayos realizados. Las razones de esta variabilidad pueden ser múltiples e incluyen:

- (1) la cepa de ratones utilizada, que, si bien en ambos casos se utilizaron ratones de la cepa CD1, esta es una cepa de ratones exocriados, por lo que presentan una gran variabilidad.
- (2) las distintas fracciones de saponinas de *Q. brasiliensis* (Fb y QB80) utilizadas, así como antígenos FhLAP producidos en distintos lotes y solubilizados en distintos solventes (TRIS y PBS).
- (3) Diferentes esquemas de vacunación utilizados, con distinta cantidad de dosis y distinta frecuencia entre las mismas.

En cuanto al desafío, es importante destacar que el modelo murino no es el mejor modelo para estudiar la infección por este tremátodo. Aunque presenta algunas ventajas, como por ejemplo su fácil y económica manipulación, y ha sido muy útil para pruebas piloto con este tremátodo, lo ideal es usar una especie de destino, es decir, ruminantes, tales como ganado ovino o bovino, donde los tremátodos se pueden desarrollar plenamente. Sumado a ello, fue muy arduo conseguir las metacercarias en cantidades y condiciones óptimas (sólo 18 % de viabilidad), debido a problemas de suministro por parte de los criadores de metacercarias. Por esta razón el desafío se debió realizar con una dosis de metacercarias subóptima, que derivó en un desafío sub-letal. Como consecuencia, murió sólo 1 animal en el grupo control (PBS), cuando lo ideal hubiese sido que el desafío fuera letal, es decir, que todos los animales del grupo PBS murieran dentro de los 45 días post-desafío. Por otra parte, el inconveniente con el grupo preñado, hizo que se debiera realizar dos ensayos por separado, uno para evaluar la respuesta inmune y protección de los animales vacunados con ISCOMs o ISCOMPro respecto a *Fh*LAP y PBS, y otro para evaluar la respuesta inmune y protección de los animales vacunados con QB80 respecto a *Fh*LAP_{rep}, por lo que no fue posible comparar entre grupos inoculados con nanoformulaciones (ISCOMs e ISCOMPro) respecto al grupo inoculado con la saponina soluble (QB80). A pesar de todas estas dificultades en el ensayo de desafío se detectó que el grupo inoculado con la novedosa formulación ISCOMPro fue capaz de desencadenar una respuesta humoral comparable o superior a la desencadenada por el grupo inoculado con ISCOMs, pero además que los animales inoculados con ISCOMPro fueron los únicos que presentaron menor esplenomegalia y menor daño hepático. Considerando además la potente respuesta desencadenada por los SBAs de *Q. brasiliensis* cuando se administraron 3 dosis de vacuna por vía s/c, creemos que sería interesante continuar explorando el potencial como adyuvantes de vacunas contra fasciolosis de las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* y en particular de la novedosa formulación ISCOMPro. En particular, en este trabajo se estudió únicamente la inmunidad desencadenada por estas novedosas formulaciones cuando eran inoculadas por vía s/c. Como se mencionó en capítulos anteriores de esta tesis, el tamaño de los ISCOMs hace que sean muy eficientes en atravesar barreras biológicas, y en movilizarse a través de capilares y de las vías linfáticas, distribuyéndose a través de la circulación sanguínea y de los órganos linfoides secundarios. Las NPs de tamaños entre 20 y 200 nm, como los ISCOMs, pueden difundir hacia los dLNs, sin necesidad de ser transportadas por las APCs, como ocurre con las partículas de mayor tamaño, aunque también son internalizadas y transportadas al dLN por las APCs residentes de tejido. Al drenar a los dLNs, son internalizadas y presentadas a las células T también por las APCs residentes del dLN. Esta “doble oleada” de presentación a las células T y B hace que los ISCOMs sean más eficientes en promover respuestas T y B que partículas de mayor tamaño^{136,336,337}. Además, se ha descrito que las partículas de mayor tamaño tienden a promover respuestas humorales, mientras que las NPs de 20-200 nm tienden a promover respuestas de células T más potentes³³⁸. También se ha demostrado que, a nivel de la mucosa intestinal, las NPs de 20-200 nm son internalizadas por las células M de las placas de Peyer, y transferidas a las DCs de forma muy eficiente, iniciando así una potente respuesta inmune³³⁹. Concretamente en el caso de los ISCOMs, se ha reportado que la inoculación por vía oral de ISCOMs con antígenos del virus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) induce altos niveles de IgA e IgG, tanto a nivel de la mucosa intestinal como a nivel sistémico, y que la inmunidad desencadenada es capaz de conferir protección frente al desafío letal con este virus en modelo murino³⁴⁰. Además, en otro estudio se demostró que la inoculación de ISCOMs junto a una proteína de fusión con péptidos de OVA₃₂₃₋₃₃₉ ligado a un adyuvante de mucosas (CTA₁-DD) es altamente inmunogénica, tanto cuando la inoculación se realiza por vía s/c, oral o i/n. Las inoculaciones por cualquiera de estas tres vías inducen una potente respuesta humoral y de células T, tanto a nivel sistémico como a

nivel de la mucosa³⁴¹. Asimismo, se ha demostrado que la inoculación de dos dosis por vía oral de una vacuna experimental de influenza adyuvantizada con ISCOMs es capaz de generar una potente respuesta humoral y celular, y también de conferir protección frente al desafío letal con influenza en modelo murino³⁴². Considerando que la vía de ingreso de *F. hepatica* a los hospederos es por vía oral, y los antecedentes en cuanto a la capacidad de los ISCOMs (formulados con *Q. saponaria*) de inducir potentes respuestas inmunes a nivel de la mucosa intestinal y también sistémicas cuando son administrados por vía oral, creemos que sería interesante explorar en el futuro la respuesta inmune desencadenada por ISCOMs formulados con saponinas de *Q. brasiliensis* (en particular ISCOMPro) y antígenos de *F. hepatica* cuando sean administrados por vía oral.

4.3.2. Inmunidad adaptativa frente a un antígeno viral

Otro objetivo de esta tesis es estudiar la capacidad adyuvante de las saponinas nativas frente a un antígeno viral. Para ello se utilizó el modelo de influenza A como se explicó previamente, y se estudió el potencial de los adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis*, particularmente de las fracciones QB80 y QB90, y sus nanoformulaciones tipo ISCOMs o IMX. Se utilizaron antígenos provenientes de vacunas comerciales de influenza estacional. Estas vacunas trivalentes, fragmentadas e inactivadas, no contienen adyuvantes y además son producidas en condiciones GMP, libres de endotoxinas, lo que hace que los antígenos sean óptimos para ser usados en este tipo de estudios.

4.3.2.1. *Respuesta humoral y celular frente al antígeno viral de influenza*

Para evaluar la respuesta desencadenada frente al antígeno viral de influenza por formulaciones conteniendo saponinas de *Q. brasiliensis*, se realizó un ensayo de vacunación en ratones hembra cepa BALB/c de 12 semanas de edad con vacunas experimentales conteniendo el antígeno de influenza obtenido de la vacuna Vaxigrip® y uno de los siguientes adyuvantes de saponinas nativas: IMXQB80, IMXQB90 o QB90 (soluble). Además, con el fin de comparar la respuesta desencadenada por las saponinas nativas contra la desencadenada por nanoformulaciones de una saponina comercial, un grupo fue inoculado con IMXQuilA® como adyuvante junto al antígeno. Como control se vacunaron animales con el antígeno de influenza sin adyuvantes (Flu), y como control negativo del ensayo un grupo fue inoculado con suero fisiológico (SF). Los animales recibieron dos dosis de la formulación correspondiente por vía s/c en la zona interescapular separadas por 14 días (d0 y d14), conteniendo 5 µg/ds de saponinas y 7,5 µg/ds de HA de influenza, tal como se muestra en la Fig 44A.

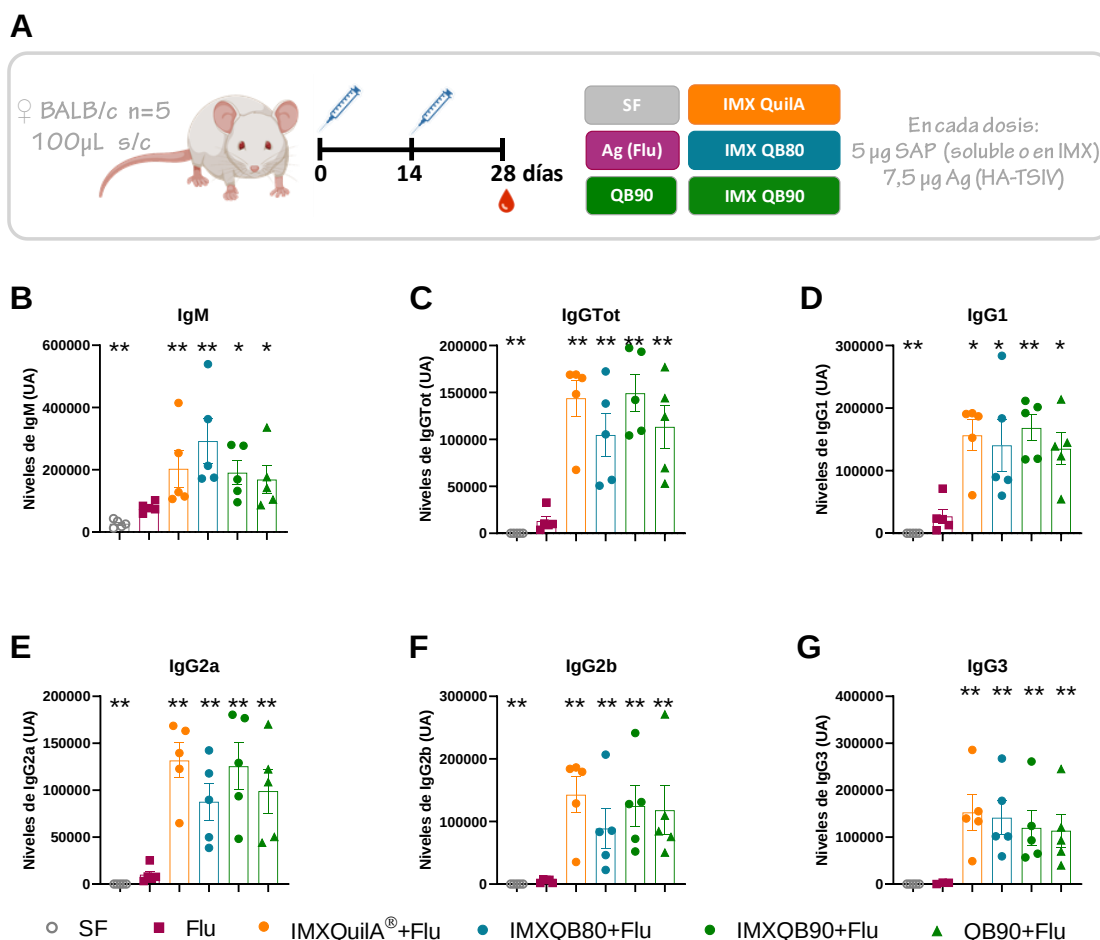


Figura 44. Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza. Esquema de vacunación (A). Los ratones hembra cepa BALB/c recibieron 2 dosis (priming d0 y booster d14) por vía s/c de una formulación con el antígeno de influenza (Vaxigrip, Sanofi, 7,5 µg de HA/ds) conteniendo como adyuvante IMXQuilA® (círculos naranjas), IMXQB80 (círculos celestes), IMXQB90 (círculos verdes), o QB90 soluble (triángulos verdes), que contenían 5 µg de saponinas, o sin adyuvante ("Flu", cuadrados fucsias). Como control se inoculó un grupo con suero fisiológico ("SF", círculos vacíos grises). Se muestran los niveles de anticuerpos séricos específicos anti-influenza IgM (B), IgGTot (C), IgG1 (D), IgG2a (E), IgG2b (F) e IgG3 (G) al d28 post priming. Se muestra la media ± SEM de cada grupo (n=5), y los valores individuales. * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ mediante el test de Mann-Whitney al comparar cada grupo contra el grupo "Flu".

Los animales inoculados con formulaciones conteniendo SBAs promovieron mayores niveles de anticuerpos IgM (Fig. 44B), IgGTot (Fig. 44C), IgG1 (Fig. 44D), IgG2a (Fig. 44E), IgG2b (Fig. 44F) e IgG3 (Fig. 44G) que el grupo inoculado con Flu, 28 días después del *priming*. No se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos entre grupos inoculados con los SBAs (ni entre SBAs de *Q. brasiliensis*, ni entre éstos respecto a IMXQuilA®). El grupo inoculado con la vacuna comercial (Flu) mostró mayores niveles de anticuerpos que el control negativo (SF) en todos los casos, salvo en los niveles de IgG3, donde no se detectaron niveles de esta subclase en el grupo inoculado con Flu ni en el control negativo (Fig. 44G). A partir de estos resultados podemos concluir que los SBAs de *Q. brasiliensis* generan una respuesta humoral más potente que la vacuna comercial, y comparable a la generada por las nanoformulaciones de la saponina comercial QuilA®. Además, al igual que ésta, generan anticuerpos IgG3, que no son generados por la vacuna comercial.

IgG3 es un potente activador del sistema del complemento, tanto por la vía clásica como alternativa, tiene gran capacidad de auto-oligomerizarse, y se une a antígenos polisacáridicos³⁴³.

En este sentido, ha demostrado poseer capacidad neutralizante frente a patógenos capsulados como *Streptococcus pyogenes*³⁴⁴, *Bacillus anthracis*³⁴⁵, *Neisseria meningitidis*³⁴⁶, entre otros³⁴⁷. En influenza, se ha demostrado que las vacunas comerciales producidas en huevos embrionados, como es el caso de Vaxigrip®, contienen antígenos polisacarídicos provenientes de la clara y del líquido allantoideo del huevo, que si bien no serían protectivos frente a un encuentro con el virus de influenza, la generación de estos anticuerpos tampoco disminuye la respuesta frente a los antígenos protectivos³⁴⁸. Además, los antígenos de Influenza tales como HA o NA están altamente glicosilados^{349,350}. Esto ha sido descrito como un mecanismo de evasión al sistema inmune, ya que la glicosilación podría enmascarar epítopes que puedan ser reconocidos por los anticuerpos neutralizantes mediante efecto estérico³⁵¹. También se ha descrito que la glicosilación podría jugar un rol dual, debido a que también podría aumentar el fitness de las variantes antigénicas que logran evadir al sistema inmune, mediante la restauración de las interacciones HA con el receptor celular^{352,353}. Dado el alto patrón de glicosilación de estos antígenos tan expuestos en este patógeno, contar con anticuerpos que reconozcan residuos oligosacáridicos, tales como IgG3, podría ser determinante en lograr la protección contra este patógeno.

En este caso, no sabemos específicamente contra qué antígeno contenido en la vacuna comercial son los anticuerpos que se generan, pero el hecho de que no se generen en la vacuna sin adyuvantes, y sí se generen en las vacunas con saponinas de *Q. brasiliensis*, indica que estos adyuvantes serían útiles en vacunas que necesiten la generación de anticuerpos IgG3 contra antígenos polisacarídicos, por ejemplo, en vacunas contra patógenos capsulados.

Más allá de las funciones de IgG3 en particular o en solitario, es interesante considerar la teoría del “modelo de cuarteto” planteada por Collins³⁵⁴. Esta teoría se basa en las características fisiológicas del ratón, y plantea que, debido a su tamaño, esta especie carece de reservas metabólicas, y para evitar deshidratarse o incluso morir al ser infectado por un patógeno mientras desencadena una respuesta inmune, debe ser capaz de lograr montar una respuesta adaptativa rápida, efectiva y eficiente³⁵⁵. Por esta razón, las respuestas de IgG se deben desarrollar rápidamente. La puesta en marcha de esta respuesta de afinidad adecuada es tan o más importante para el ratón que el hecho de montar una respuesta de alta afinidad a través del proceso de hipermutación somática. En los humanos las distintas subclases de anticuerpos IgG compiten entre sí por mayor afinidad con el antígeno, sin embargo, el ratón debe montar una respuesta rápidamente y debe evitar malgastar energía en generar anticuerpos que compitan entre sí. En el modelo murino de cuarteto, se plantea que las subclases de IgG de ratón actúan de forma coordinada y complementaria más que en competencia³⁵⁴. En general, los análisis y las discusiones sobre la respuesta humoral en ratón se centran en las funciones específicas de cada subclase, como si actuaran separadamente. Sin embargo, al considerarlas por separado, las propiedades de algunas subclases como IgG1 o IgG3 no parecen tener sentido. Los anticuerpos IgG1 se vinculan clásicamente a una respuesta de tipo Th2. Estos anticuerpos pueden neutralizar toxinas y virus gracias a que la unión a estos impide estéricamente que se unan al receptor celular del hospedero y causen el daño correspondiente, pero no son capaces de activar el complemento o de desencadenar funciones efectoras mediadas por el receptor de Fcγ (FcγR). Por lo tanto, si sólo se secretara esta subclase de anticuerpos, su efecto sería muy reducido. Por otro lado, como se mencionó previamente, IgG3 es considerado el isotipo mayoritario que se produce en respuesta a antígenos T-independientes, como por ejemplo antígenos polisacarídicos³⁵⁶. La fijación del complemento por parte de los inmunocomplejos de

IgG3 resulta en el reclutamiento de células inflamatorias, pero dado que los anticuerpos de IgG3 no son capaces de unirse a FcγR³⁴⁷, si se considera la acción únicamente de IgG3, estas células reclutadas no serían capaces de desencadenar las funciones efectoras, y por lo tanto la acción de los anticuerpos IgG3 anti-antígenos polisacáridicos sería muy ineficiente. Al considerar las acciones de cada subclase actuando coordinadamente con las otras subclases, es posible entender mejor cómo funciona la respuesta inmune murina. Cuando se expresan las 4 subclases en simultáneo, es posible resolver esas “incongruencias” sobre el modo de acción de los anticuerpos y el mecanismo que se desencadena. La rápida secreción de anticuerpos IgG3, asegura que las funciones efectoras de IgG comiencen tempranamente en la respuesta, aún en ausencia de la colaboración de las células T. Estos anticuerpos activan el complemento, y desencadenan una cascada de eventos pro-inflamatorios. Aunque los anticuerpos IgM también cumplen esta función, dado que los anticuerpos IgG3 tienden a auto-agregarse, logran una activación más potente. Además, debido a la característica pentamérica de IgM, se une a antígenos que estén debidamente separados (dispuestos espaciadamente), por ejemplo, en la superficie bacteriana o viral³⁵⁷. Como consecuencia de su habilidad de auto-agregarse, los IgG3 bivalentes pueden unirse al antígeno de forma multivalente y con alta afinidad a antígenos que estén espaciados de forma más variable³⁵⁸.

En cuanto al perfil de la respuesta humoral, en ningún caso se obtuvo relaciones de los niveles de IgG2a/IgG1 (Fig 45A) y de IgG2b/IgG1 (Fig 45B) mayores a 1. De los grupos inoculados con saponinas de *Q. brasiliensis*, sólo QB90 mostró mayor relación que Flu y sólo en el caso de IgG2b/IgG1 (Fig 45B). No obstante, no se encontraron diferencias entre grupos vacunados con saponinas nativas respecto a IMXQuilA®, y todos los grupos vacunados con SBAs mostraron relaciones de los niveles IgG2a/IgG1 e IgG2b/IgG1 más cercanas a 1 que Flu. Este resultado implica que los animales inoculados con Flu generaron una respuesta polarizada hacia Th2, mientras que los animales inoculados con los SBA lograron generar una respuesta balanceada Th1/Th2.

Además, todos los grupos inoculados con SBAs mostraron una reacción de DTH mayor que el promedio de los animales inoculados con Flu a las 24 hs de la inoculación i/d (Fig 45C), y no se encontraron diferencias entre los grupos que contenían los distintos SBAs. Estos resultados indican que los adyuvantes de *Q. brasiliensis*, tanto de forma soluble (QB90) como en nanopartículas tipo IMXs logran desencadenar una respuesta celular más potente que el grupo inoculado sin adyuvantes, y comparable a la desencadenada por nanopartículas formuladas con IMXQuilA®.

Respecto a la producción de células secretoras de anticuerpos (ASC) obtenidas del bazo al d28, todos los grupos inoculados con SBAs logran mayor frecuencia de ASC IgGTotal que el grupo Flu (Fig 45D). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ASC IgG1 respecto a Flu, aunque los grupos inoculados con SBAs muestran una tendencia hacia una mayor frecuencia de éstas (Fig 45E). No se encontraron diferencias en la frecuencia de ASC entre los grupos vacunados con SBAs en ninguno de los 3 casos (ASC IgGTotal, IgG1 e IgG2b). Todos los grupos inoculados con saponinas de *Q. brasiliensis* (IMXQB90, IMXQB80 y QB90) mostraron mayor frecuencia de ASC IgG2a que Flu al d28, salvo, sorprendentemente, el grupo inoculado con IMXQuilA®, que no mostró diferencias respecto a Flu (Fig 45F). Este último resultado contrasta drásticamente con los altos niveles de anticuerpos IgG2a que mostraron los animales inoculados con IMXQuilA® al d28 (Fig. 44E, círculos naranjas), sugiriendo que, aunque los animales inoculados con IMXQuilA® presentaban menor frecuencia de ASC IgG2a, éstas eran

capaces de producir altos niveles de anticuerpos. Para entender mejor qué está ocurriendo con la producción de IgG2a, más adelante en esta tesis se discutirán los resultados de un ensayo en donde se midió la frecuencia de ASC y la cinética de anticuerpos a largo plazo (sección 4.3.2.6).

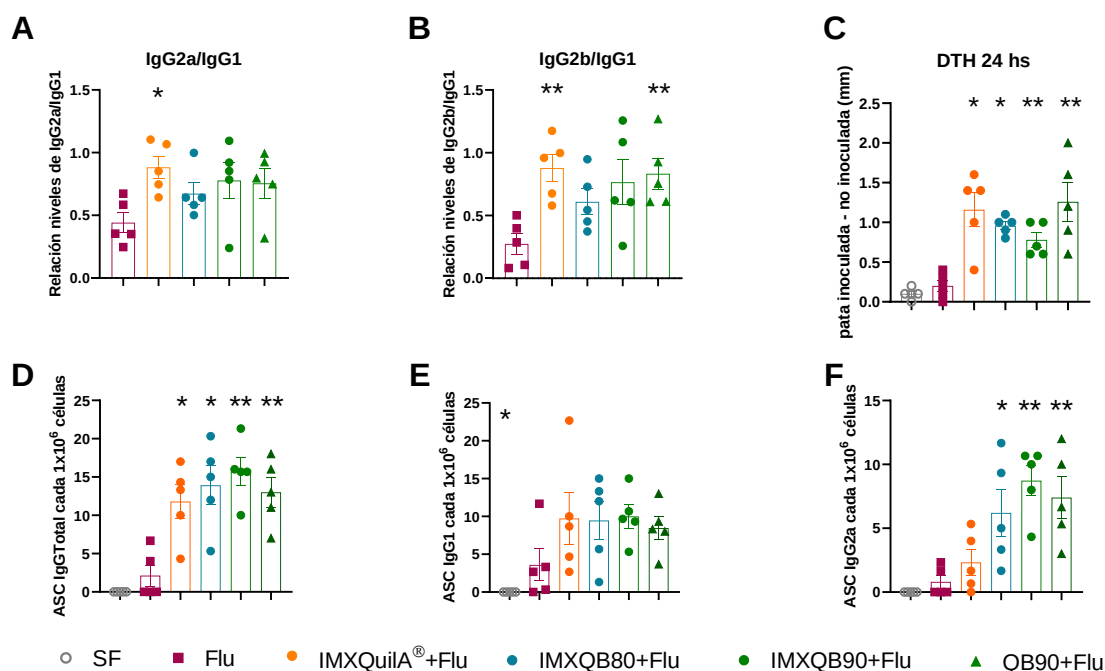


Figura 45. Caracterización de la respuesta inmune en ensayo de vacunación s/c contra influenza. Relaciones de los niveles de anticuerpos IgG2a/IgG1 (A) e IgG2b/IgG1 (B) al d28. Reacción de DTH realizada al d28, 24 hs post inoculación i/d (C). Frecuencia de células productoras de anticuerpos (ASC) específicos contra influenza IgGTotal (D), IgG1 (E) e IgG2a (F) al d28 post priming obtenidas de bazo, determinada mediante ELISPOT. Se muestra la media ± SEM de cada grupo, y los valores individuales. * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ mediante el test de Mann-Whitney al comparar cada grupo contra el grupo "Flu".

Para continuar caracterizando la respuesta inmune desencadenada, se estudió la concentración de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos estimulados con ConA mediante citometría de flujo utilizando el kit LegendPlex™. Los animales inoculados con SBAs mostraron una tendencia hacia una mayor producción de GM-CSF (Fig. 46A), IL-6 (Fig. 46B), IL-10 (Fig. 46C), TNF- α (Fig. 46D) e IL-1 α (Fig. 46E) respecto a los grupos Flu y control negativo. En algunos casos particulares este aumento es significativo. No se encontraron diferencias entre los grupos inoculados con SBAs respecto al grupo inoculado con Flu o SF en el caso de IFN- γ e IL-17A (datos no mostrados). Por otra parte, los niveles de IL-23A, MCP-1, IL-12p70, IL-27, IFN- β , IL-1 β en las condiciones del ensayo estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica (datos no mostrados).

GM-CSF (del inglés *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) es un factor de crecimiento hematopoyético que estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras de la médula ósea hacia granulocitos tales como macrófagos y DCs, y permite la supervivencia y activación de células mieloides maduras^{359,360}. Es necesario para realizar hematopoyesis "de emergencia" para lograr eliminar las infecciones virales mediante el reclutamiento de nuevos macrófagos y otros granulocitos³⁶¹. GM-CSF cumple un rol fundamental en la inflamación, ya que es producido por varias células del sistema inmune incluyendo monocitos, macrófagos, y células B y T activadas en respuesta a una infección³⁶². Las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF- α e IL-23 inducen la producción de GM-CSF por parte de

células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas³⁶³. Varios estudios demuestran que las células T productoras de GM-CSF son críticas en la respuesta inmune frente a varios patógenos bacterianos como *Mycobacterium tuberculosis* o virales tales como el virus Epstein-Barr o el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV)^{364,365}. Esto se debe en gran parte a las acciones luego del reclutamiento y activación de células mieloides por GM-CSF³⁶⁶. En particular, GM-CSF promueve la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio M1 *in vitro*^{367,368}, lo que a su vez derivará en la producción de quemoquinas promotoras del reclutamiento leucocitario (tales como CCL2, CCL24, CCL5, y CCL1), y citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12p70, IL-23, e IL-1 β ³⁶⁷. Además, GM-CSF es fundamental para la maduración de macrófagos fetales en macrófagos alveolares (AM), así como también para el mantenimiento en estado estacionario de DCs residentes de tejido no-linfoide CD103⁺ en múltiples tejidos de ratón, que son cruciales para desencadenar la activación de células T CD8⁺ en el pulmón³⁶⁹. La respuesta inmune frente a influenza se basa en la acción de células B, T CD8⁺, y en células de la inmunidad innata estimuladas por AMs^{370,371}. Durante la infección pulmonar, GM-CSF es secretado por varias células incluyendo macrófagos, células endoteliales, epiteliales alveolares tipo II, fibroblastos, y células T. Cuando se libera GM-CSF, éste aumenta la resistencia a la infección de AMs y otras células, aumentando la eliminación viral, reduciendo el daño pulmonar, y aumentando las tasas de supervivencia durante la infección por el virus de influenza^{369,372}. Por estas razones creemos que la mayor producción de GM-CSF por parte de esplenocitos de ratones vacunados con SBAs, y la presencia de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 α nos indican que los SBAs son capaces de desencadenar una potente respuesta proinflamatoria, que podría conferir protección frente a una subsiguiente infección por influenza.

TNF- α ha demostrado poseer potente actividad antiviral frente al virus de influenza aviar, suina, o humana, siendo incluso más potente que la actividad antiviral de IFN- γ o - α . Por esta y otras observaciones se ha postulado que TNF- α actúa como primera línea de defensa frente a la infección por influenza³⁷³, es muy promisorio que este tipo de adyuvante promueva la producción de esta citoquina.

La presencia de IL-10 podría explicarse por lo que se discutió previamente para el caso de FhLAP. En un contexto de fuertes componentes proinflamatorios, el sistema inmune tiende a autorregularse para evitar el daño tisular excesivo, y para ello produce mediadores inmunológicos, tales como IL-10, que regulen la respuesta inmune generada. La generación de mayor cantidad de IL-10 en los grupos inoculados con SBAs concuerda con el hecho de que estos adyuvantes promovieron mayor producción de las citoquinas proinflamatorias GM-CSF o IL-6, y sea un mecanismo de autorregular la respuesta inmune desencadenada.

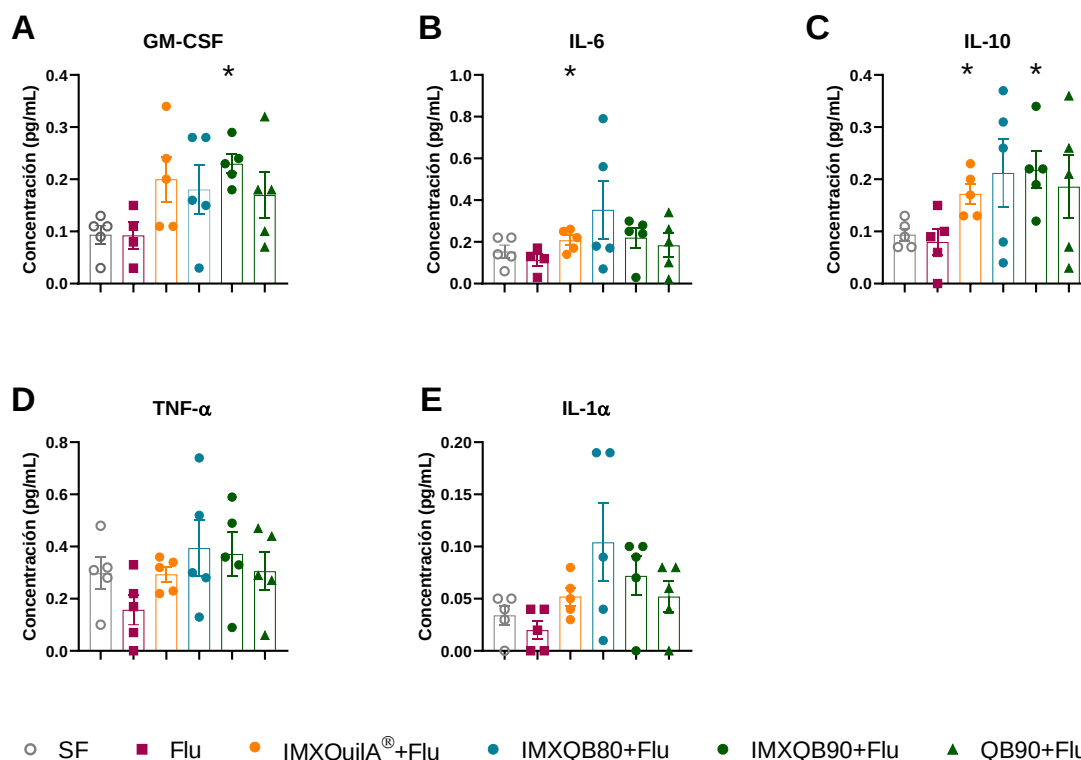


Figura 46. Linfoproliferación y secreción de citoquinas en sobrenadante de esplenocitos de ratones vacunados contra influenza. Los esplenocitos obtenidos al d28 post-priming de ratones inmunizados se estimularon *in vitro* durante 72 hs con 1 µg/mL de ConA o sin estímulo. Transcurridas 72 hs, se midió la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos. La concentración de las citoquinas GM-CSF (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF-α (D) e IL-1α (E) se determinó por citometría de flujo utilizando el kit LegendPlex™, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se muestra la media ± SEM de cada grupo, y los valores individuales (n = 5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo respecto al grupo Flu al d28 post priming en asteriscos negros. * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ mediante el test de Mann-Whitney.

A partir de este ensayo de vacunación en ratones BALB/c podemos concluir que los adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* son capaces de promover una respuesta inmune balanceada Th1/Th2, que incluye una potente producción de anticuerpos, mayor a la respuesta humoral desencadenada por la vacuna comercial sin adyuvantes (grupo Flu), y similar a la desencadenada por las nanoformulaciones de la saponina comercial QuilA® (IMXQuilA®). En particular IMXQB90 fue capaz de desencadenar citoquinas de fuerte perfil proinflamatorio, lo que hace a este adyuvante óptimo para ser utilizado en formulaciones vacunales contra patógenos virales, tales como influenza.

En ratones el *background* genético es determinante en el balance de la respuesta inmune con fenotipo Th1/Th2^{374,375}. Como ha sido ampliamente reportado, los ratones C57Bl/6J en general producen citoquinas de tipo Th1, con una potente generación de IFN-γ y baja producción de IL-4, mientras que los ratones BALB/c, como los utilizados en este ensayo, tienden a favorecer la producción de citoquinas de tipo Th2, y en general producen bajos niveles de IFN-γ y altos niveles de IL-4^{376,377}. Dado que los ratones utilizados en este ensayo son de la cepa BALB/c, los resultados obtenidos son muy promisorios, ya que la vacunación con formulaciones conteniendo saponinas nativas, en particular con IMXQB90, logró revertir la tendencia genética y desencadenar una respuesta balanceada Th1/Th2, efectiva en combatir infecciones virales tales como influenza.

En base a estos promisorios resultados, nos propusimos continuar caracterizando la respuesta inmune frente a influenza promovida por formulaciones conteniendo adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis*, con diferentes cantidades de antígeno por dosis para evaluar el efecto dose-sparing, o cuando estas formulaciones eran inoculadas por distintas vías.

4.3.2.2. Evaluación del efecto dose-sparing en el modelo de influenza

Dado que una de las formas de preparación frente a nuevas epidemias o pandemias reside en reducir la cantidad de antígeno necesario por dosis de vacuna, evaluamos la capacidad de la formulación del antígeno de Influenza en ISCOMs (IQB90-Flu) en promover el efecto *dose-sparing*. Previamente demostramos que un extracto acuoso obtenido de hojas de *Q. brasiliensis* (AE), al ser utilizado como adyuvante de vacunas con el antígeno del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en modelo murino, era capaz de promover el efecto *dose-sparing*, logrando disminuir la cantidad de antígeno requerida hasta 5 veces¹³⁰.

Para evaluar si los SBAs de *Q. brasiliensis* promueven el efecto *dose-sparing* en el modelo de influenza se realizó un nuevo ensayo de vacunación en ratones hembra cepa BALB/c, utilizando el antígeno proveniente de la vacuna de influenza estacional producida por el Instituto Butantan (cepas 2016) y nanopartículas tipo ISCOMs de QB-90 (IQB90-Flu). En este ensayo se vacunaron grupos conteniendo IQB90 y la dosis completa de antígeno (7,5 µg/ds), 1/10 de antígeno (0,75 µg/ds) y 1/100 de antígeno (0,075 µg/ds). Como control se inoculó un grupo con la dosis completa de antígeno (7,5 µg/ds) sin adyuvantes ("Flu"). Los animales recibieron dos dosis de la formulación correspondiente, a los días 0 y 14, según el esquema de la Figura 47A.

Al evaluar la respuesta humoral, se observó que al d14 los animales inoculados con IQB90 y la dosis completa de antígeno mostraban mayores títulos de IgM que los animales del control sin adyuvantes, pero los animales inoculados con IQB90 y 1/10 o 1/100 de antígeno mostraban los mismos niveles de IgM que el grupo Flu (Fig. 47B). Este resultado no se observa para los niveles de IgA al d28, ya que en este caso sólo los grupos inoculados con la dosis completa de antígeno (con o sin adyuvante) muestran niveles de estos anticuerpos, y los grupos inoculados con IQB90 y 1/10 y 1/100 de la cantidad de antígeno muestran niveles de IgA menores que el grupo Flu (Fig. 47C). No obstante, al d28 se observa que los grupos inoculados con IQB90 y 1/10 o 1/100 de antígeno muestran niveles mayores o comparables al grupo Flu para IgGTotal (Fig. 47D) y las subclases IgG1 (Fig. 47E), IgG2a (Fig. 47F), IgG2b (Fig. 47G) e IgG3 (Fig. 47H).

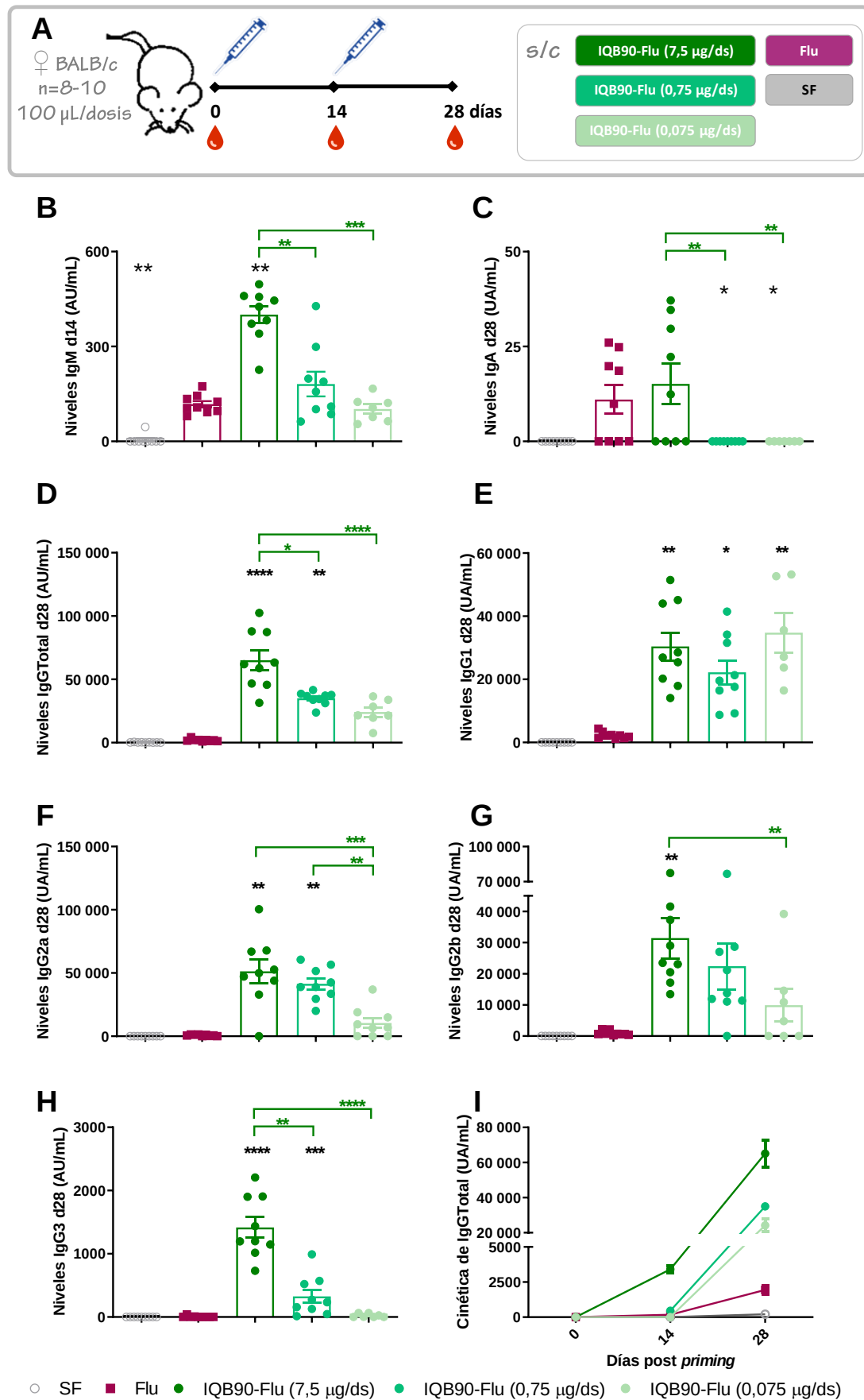


Figura 47. Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza y evaluación del efecto dose-sparing. Las inmunizaciones por vía s/c se realizaron al d0 (priming) y al d14 (booster), con formulaciones conteniendo distintas

concentraciones de adyuvante IQB90 y antígeno de influenza, antígeno de influenza solo ("Flu"), o buffer PBS como control negativo ("PBS"), según se muestra en el esquema A. Para evaluar el efecto *dose-sparing* de los adyuvantes se inocularon 2 grupos conteniendo 1/10 (IQB90-Flu 0,75 µg/ds) y 1/100 (IQB90-Flu 0,075 µg/ds) de la cantidad de antígeno contenida en las dosis del grupo "Flu" (sin adyuvante). Se midieron los niveles de anticuerpos séricos específicos anti-influenza. Se muestran los niveles séricos de IgM al d14 (B), e IgA(C), IgGTotal (D), IgG1 (E), IgG2a (F), IgG2b (G), e IgG3 (H) al d28 post priming. La cinética de los niveles de anticuerpos IgGTotal se muestra en I. Se muestra la media ± SEM de cada grupo, y los valores individuales (n=8-10). * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$ y **** indica $p < 0.0001$, mediante el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn (cada grupo contra el grupo "Flu" se indica con asteriscos negros; comparación entre grupos conteniendo adyuvante se indica en asteriscos verdes). Adaptado de Rivera-Patron et. al. 2021²⁸³.

En particular, la generación de anticuerpos IgG2a es crucial para combatir infecciones virales, incluyendo influenza. Los anticuerpos de este isotipo cumplen un rol fundamental en la protección ya que son capaces de unirse a los receptores Fc con mayor afinidad que otros isotipos, activando el mecanismo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), y los mecanismos de opsonofagocitosis hacia las células infectadas por influenza³⁷⁸. En el caso de los niveles de IgG3, si bien no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo IQB90 1/100 y Flu, se observa que el grupo con adyuvante y 1/100 de antígeno muestra una tendencia hacia mayores niveles de esta subclase. Estos resultados muestran que al incorporar IQB90 a la formulación, es posible reducir 10 y hasta 100 veces la cantidad de antígeno y aún se siguen co-induciendo anticuerpos de todas las subclases de IgG, generando una respuesta en línea con el modelo de cuarteto propuesto por Collins³⁵⁴ y mencionado previamente en esta tesis.

Los resultados en los niveles de IgGTotal y subclases promovidos por las formulaciones conteniendo IQB90 y 1/10 o 1/100 de antígeno es muy auspiciosa en cuanto a la capacidad de IQB90 de promover el efecto *dose-sparing*, lo que podría ser crucial para poder aumentar el número de dosis disponibles en el caso de una pandemia de influenza. No obstante, las diferencias encontradas en los niveles de IgA, y su rol en la protección frente a influenza hacen que sea fundamental evaluar el comportamiento de los animales vacunados con las distintas cantidades de antígeno frente al desafío con el virus de influenza, como se expondrá mas adelante.

Además de los niveles de anticuerpos, es importante conocer el perfil y la funcionalidad de la respuesta humoral desencadenada por IQB90. Al estudiar la relación entre los niveles de IgG2a/IgG1, se evidenció que los animales inoculados con IQB90 y 1/10 de Flu presentaban una relación mayor a 1, mientras que en el grupo sin adyuvante (Flu) y IQB90 1/100, esta relación era menor a 1 (Fig. 48 A). Este resultado indicaría que IQB90 está induciendo un cambio en la polarización de la respuesta hacia el fenotipo Th1, aún en menor presencia de antígeno. Este resultado es consistente con resultados previos de nuestro grupo, en los que se estudió la respuesta desencadenada por adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* junto a otros antígenos virales^{128-130,327}, así como también para otras vacunas contra influenza experimentales conteniendo adyuvantes basados en saponinas³⁷⁹ o ya aprobadas⁵¹.

Para determinar la funcionalidad de los anticuerpos generados se realizó un ensayo de inhibición de la aglutinación (HAI, del inglés *hemagglutination inhibition assay*) utilizando glóbulos rojos de pavo, como se explicó en la sección Materiales & Métodos. Los anticuerpos que tienen como blanco al dominio globular de HA al unirse a esta región impiden la interacción con los residuos de ácido siálico del receptor del hospedero, bloqueando de esta manera el ingreso del virus de influenza a la célula hospedera, por lo que se consideran como anticuerpos neutralizantes. Es importante destacar que los títulos de HAI se relacionan de forma *imperfecta* con la protección,

por lo que se consideran un correlato de eficacia vacunal no mecanístico (nCOP), también conocido como *surrelato* de eficacia vacunal. No obstante, el ensayo de HAI es un método adecuado para evaluar este aspecto, siendo utilizado incluso a nivel clínico, ya que es aceptado por distintas agencias reguladoras para la aprobación de vacunas contra influenza a nivel mundial^{241,249}. Incluso en Estados Unidos el título de HAI es un requisito para la aprobación de vacunas contra influenza por parte de la FDA³⁸⁰.

En este estudio los animales inoculados con IQB90-Flu ya sea con la dosis completa o 1/10 o 1/100 de la dosis de antígeno desencadenaron títulos de HAI mayores o comparables a los títulos del grupo inoculado con Flu sin adyuvante (Fig 48B). Este resultado es de gran importancia, ya que implica que el efecto *dose-sparing* observado previamente en los niveles de anticuerpos y en la relación de los niveles IgG2a/IgG1 es efectivo, sugiriendo que serían igualmente efectivas en conferir protección frente a la infección por influenza que la formulación con la dosis completa de antígeno.

Para evaluar si efectivamente la respuesta inmune desencadenada por las formulaciones de IQB90 con las distintas dosis de antígeno confiere protección frente a influenza, los ratones vacunados (según el esquema de la Fig. 47A) fueron desafiados por vía i/n con una dosis subletal del virus de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 (1×10^3 UFP) 28 días luego del *priming*. A partir de ese momento, los animales se monitorearon diariamente durante 14 días para evaluar signos de enfermedad (piloerección, pérdida de movilidad, sobrevida) y pérdida de peso. Además, se mantuvieron grupos de animales centinelas, que no fueron vacunados ni desafiados, como control adicional del peso de los animales (datos no mostrados). Los animales inoculados con Flu mostraron un rápido descenso del peso corporal, que no pudo ser recuperado a lo largo del ensayo, hasta el día 14 post desafío (Fig 48 C). Sin embargo, los animales inoculados con IQB90-Flu con la dosis completa de antígeno mantuvieron su peso corporal o incluso lo aumentaron, a pesar de una ligera disminución en los primeros 2-4 días post desafío (dpd). Además, los animales que habían recibido un décimo o un céntimo de la cantidad de antígeno junto a IQB90 mostraron una disminución en el peso corporal en los primeros dpd, pero se recuperaron rápidamente, y no se observaron diferencias significativas con los animales que recibieron la dosis completa sin adyuvante (Fig 48C). Estos resultados indican que la formulación conteniendo IQB90 induce protección frente al desafío subletal del virus de influenza en modelo murino incluso si se inyecta diez o cien veces menos la cantidad de antígeno que en la formulación sin adyuvantes.

Considerando todos los resultados en su conjunto, podemos concluir que la inoculación de las formulaciones de IQB90-Flu conteniendo 7,5 o 0,75 $\mu\text{g}/\text{ds}$ de antígeno Flu por dosis por vía s/c son capaces de inducir buenos niveles de anticuerpos y una respuesta mixta Th1/Th2, polarizada hacia Th1, efectiva en conferir protección frente a infecciones de influenza estacional³⁸⁰.

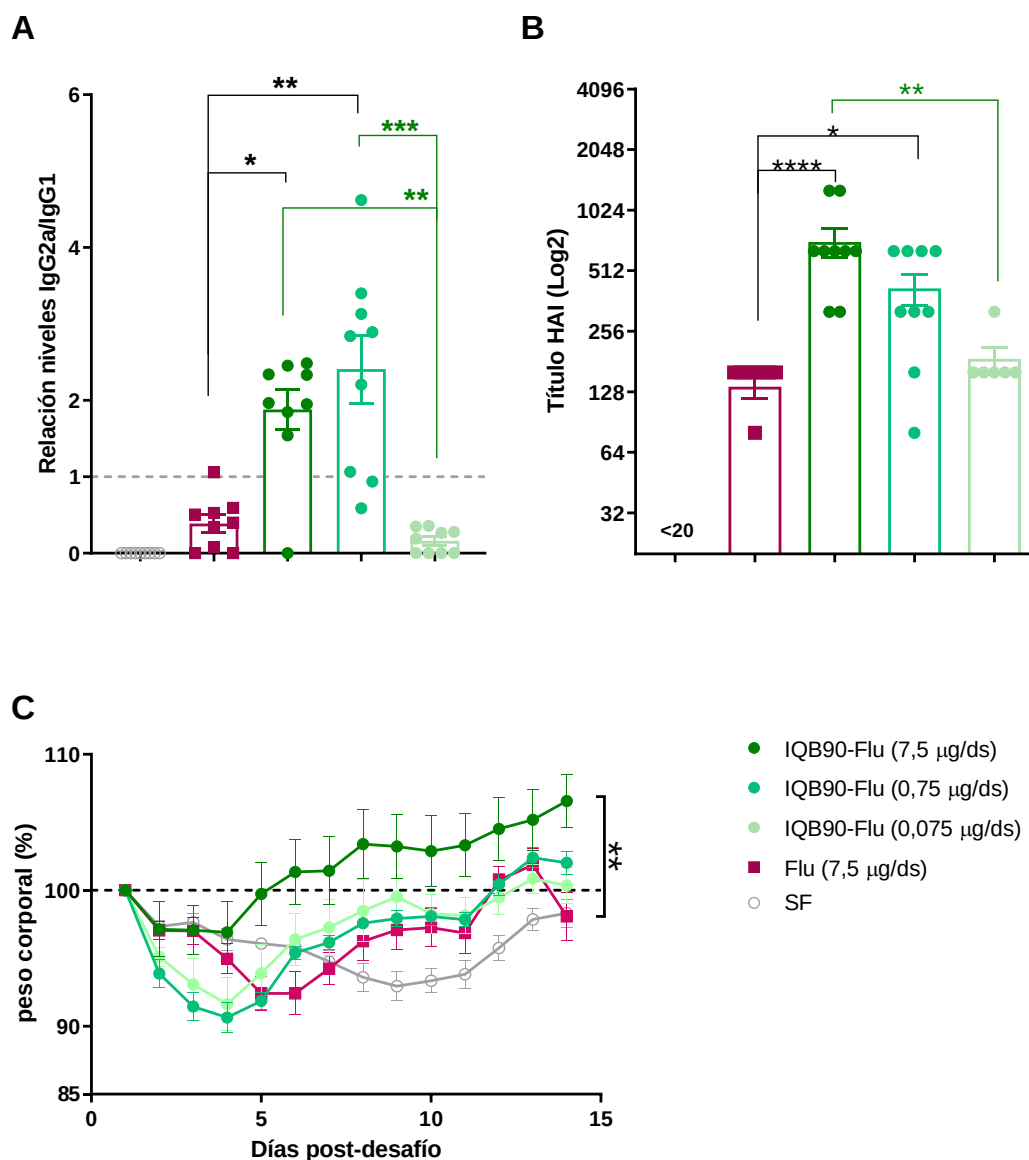


Figura 48. Perfil de la respuesta humoral, funcionalidad de anticuerpos y evolución del peso corporal frente al desafío subletal con influenza en la evaluación del efecto dose-sparing. Los animales fueron inoculados por vía s/c con IQB90-Flu (símbolos y barras verdes) con 7,5; 0,75 o 0,075 µg/ds de antígeno Flu; con 7,5 µg/ds antígeno Flu sin adyuvante (símbolos y barras fucsia), o control negativo (inoculados con suero fisiológico, símbolos grises). Se muestra la relación de los niveles de anticuerpos séricos IgG2a/IgG1 al d28 (A) y los títulos de anticuerpos capaces de inhibir la hemaglutinación al d28 (B). Se muestra la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales (n=8-10). Para comparaciones entre 2 grupos se utilizó el test de Mann-Whitney, mientras que para comparaciones entre 3 o más grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn (cada grupo contra el grupo "Flu" se indica con asteriscos negros; comparación entre grupos conteniendo adyuvante se indica en asteriscos verdes). 28 días luego del priming, fueron desafiadas con una dosis de 10^3 UFP del virus de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 por vía i/n. Los animales se observaron a diario durante 14 días para monitorear signos de enfermedad, la sobrevida, y el peso corporal. Se muestran los cambios en el peso corporal en porcentaje (media $\pm$ SEM), considerando como 100 % su peso el día previo al desafío (C). Los datos se analizaron mediante Two-way ANOVA y test LSD de Fisher, comparando a los grupos contra el grupo "Flu". En todos los casos * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$. Adaptado de Rivera-Patron et. al. 2021²⁸³.

4.3.2.3. Respuesta humoral y protección frente al desafío mediante la inoculación intranasal de IQB90-Flu

La vía de inoculación de las vacunas es fundamental ya que también contribuye al tipo de respuesta que se va a desencadenar. Idealmente, las vacunas deberían imitar a los patógenos, no solo por los antígenos específicos, sino en la vía de ingreso al organismo.

Para continuar evaluando la capacidad adyuvante de las saponinas de *Q. brasiliensis*, en el modelo de influenza, se realizó un ensayo de vacunación y desafío en ratones utilizando IQB90 y el mismo antígeno de influenza que en el ensayo anterior (obtenido de la vacuna de influenza estacional producida por el Instituto Butantan cepas 2016), en el que hembras BALB/c fueron inoculadas por vía i/n con IQB90 conteniendo 7,5 µg/ds de antígeno. Como control del ensayo se vacunó un grupo solo con antígeno de influenza ("Flu", 7,5 µg/ds), según el esquema de la Figura 49A.

Luego de la inoculación por vía i/n la formulación IQB90-Flu desencadenó mayores niveles de IgM que la formulación sin adyuvantes ("Flu") 14 días post priming (Fig. 49B), así como también mayores niveles de IgA 28 días post priming (Fig. 49C). Asimismo, IQB90-Flu desencadenó mayores niveles de IgGTotal y de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, que Flu (Fig. 49D-I).

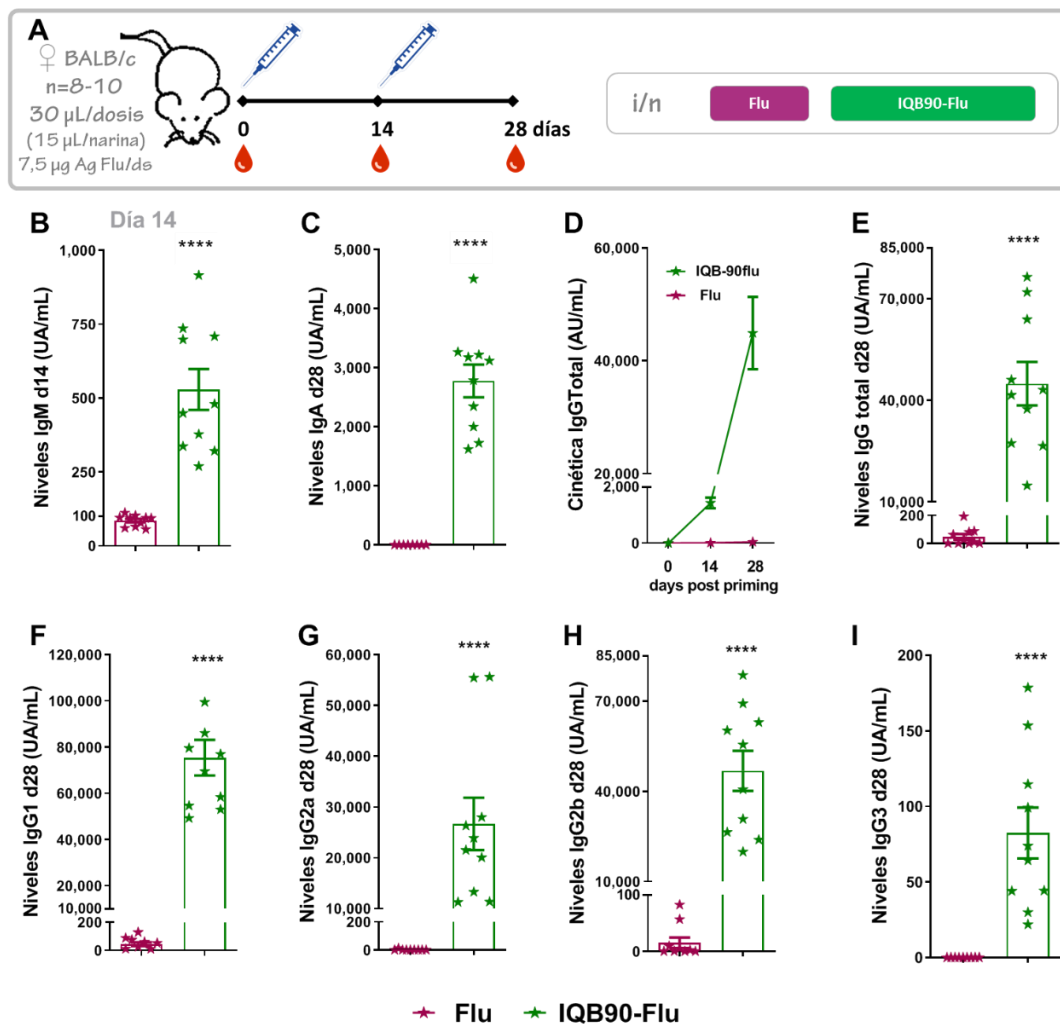


Figura 49. Ensayo de vacunación intranasal contra influenza A. Esquema de vacunación (A). Los ratones hembra cepa BALB/c recibieron 2 dosis (priming d0 y booster d14) por vía i/n de una formulación con el antígeno de influenza conteniendo IQB90 como adyuvante ("IQB90-Flu", estrellas verdes) o sin adyuvante (vacuna comercial Butantan,

“Flu”, estrellas fucsias. Se midieron los niveles de anticuerpos séricos específicos anti-influenza. Se muestran los niveles de IgM al d14 (B), los niveles de IgA al d28 (C), la cinética de IgGTotal (D), y los niveles de IgGTotal (E), IgG1 (F), IgG2a (G), IgG2c (H), e IgG3 (I) al d28. Se muestra la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales ($n=8-10$). **** indica $p < 0.0001$, por el test de Mann-Whitney. Adaptado de Rivera-Patron et. al. 2021²⁸³.

La generación de una respuesta inmune de mucosas podría contribuir a la generación de anticuerpos específicos IgA secretorios, que son cruciales en la prevención de la infección por parte de los patógenos respiratorios. Dado que impiden la infección, cortan la transmisión del virus entre individuos, contribuyendo a la generación de inmunidad de rebaño³⁸¹, mientras que la generación de anticuerpos IgG sistémicos contribuyen a una mejor protección contra la enfermedad³⁸². Además, la vía i/n presenta la ventaja de que es de fácil acceso, y como los tejidos mucosos están altamente vascularizados, las células inmunes efectoras se diseminan entre ellos, por lo que la respuesta inmune puede desencadenarse en tejidos mucosos distales. Además, al no requerir el uso de agujas, la inmunización i/n presenta la ventaja de que previene el riesgo de infecciones por otros agentes³⁸³. Por otra parte, lograr desencadenar una potente respuesta de mucosas en la vía aérea es muy difícil debido a los mecanismos tolerogénicos que operan en estos tejidos para evitar las respuestas exacerbadas frente a antígenos no propios pero inofensivos que permanentemente ingresan a través de estas vías con la respiración. La internalización y el procesamiento antigénico en los tejidos mucosos es más complejo que en otros tejidos. Por estas razones, los adyuvantes que se utilicen para potenciar respuestas inmunes de mucosas deben ser capaces de promover respuestas inmunes potentes y eficientes. Para ello, los adyuvantes deben promover la internalización de antígenos por parte de las DCs, actores clave en la activación de respuestas inmunes adaptativas en el pulmón, lo que derivará en procesamiento y la adecuada presentación de antígenos por parte de las DCs a las células T y B, y a la activación de éstas. Se ha reportado que las sustancias particuladas son mejor internalizadas en las DCs asociadas a tejidos linfoides de mucosas³⁸⁴. La forma, el tamaño y la naturaleza de las nanopartículas tipo ISCOMs son cruciales para optimizar la internalización de antígenos por parte de las DCs y evitar células fagocíticas, como macrófagos alveolares³⁸⁵, tal como ha sido demostrado para ISCOMs formulados con saponinas de *Q. saponaria* e influenza³⁸⁶. Además, el adyuvante debe ser seguro y bien tolerado, y no debe afectar al sistema nervioso central. Desafortunadamente una vacuna contra influenza adyuvantizada con la enterotoxina lábil por calor (LT) de *E. coli* debió ser retirada del mercado por presentar severos efectos adversos neurológicos para las personas²³³. Sin embargo, se ha demostrado que los ISCOMs son seguros, bien tolerados, y no presentan este tipo de complicaciones³⁰⁸. Teniendo en cuenta estas consideraciones, y la respuesta inmune desencadenada por la inoculación i/n de IQB90-Flu, particularmente los títulos de IgA inducidos (Fig. 49C) notoriamente superiores a los inducidos por vía subcutánea (Fig. 47C), los ISCOMs de *Q. brasiliensis* muestran resultados muy auspiciosos para ser utilizados como adyuvantes en vacunas contra influenza que se administren por vía i/n.

Al estudiar la relación entre los niveles de IgG2a/IgG1, se observa que los animales inoculados con IQB90-Flu muestran una relación más cercana a 1 que los animales inoculados con Flu sin adyuvante (Fig. 50 A). Este resultado concuerda con lo observado en la inoculación por vía s/c, e indican que mientras el grupo inoculado con Flu muestra una polarización de la respuesta hacia el fenotipo Th2, los animales inoculados con IQB90-Flu por vía i/n también tienden a generar una respuesta balanceada Th1/Th2, aún cuando son de la cepa BALB/c y por su *background* genético tienden a polarizar la respuesta hacia un perfil Th2³⁷⁴⁻³⁷⁷. Además, los anticuerpos

generados por los animales inoculados con IQB90-Flu presentaban mayores títulos de inhibición de la aglutinación que los animales inoculados sin adyuvante (Fig. 50B). Este resultado es muy promisorio, ya que la inoculación de IQB90-Flu por vía i/n genera mayores títulos de anticuerpos que Flu, los cuales serían protectivos frente a la infección con influenza. De todas maneras, para corroborar esto, los animales fueron sometidos a un desafío subletal con una cepa de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 (1×10^3 UFP) por vía i/n al d28 post-priming. Los animales inoculados con IQB90-Flu mostraron una leve pérdida de peso en los primeros días post-desafío, pero se recuperaron rápidamente, y mostraron un mejor mantenimiento o incluso aumento del peso corporal que los animales inoculados con Flu sin adyuvante (Fig. 50C), corroborando que la inoculación por vía i/n de IQB90-Flu es capaz de conferir mejor protección frente a una infección con influenza que la inoculación de la vacuna comercial.

No obstante, sería interesante en el futuro evaluar si el efecto *dose-sparing* conferido por la inoculación por vía s/c de IQB90-Flu también se observa en la inoculación por vía i/n de esta formulación.

Además, aunque los resultados obtenidos fueron muy promisorios, el desafío realizado fue subletal, por lo que nos propusimos evaluar si estas novedosas formulaciones son capaces de efectivamente conferir protección frente a un desafío letal con el virus de influenza.

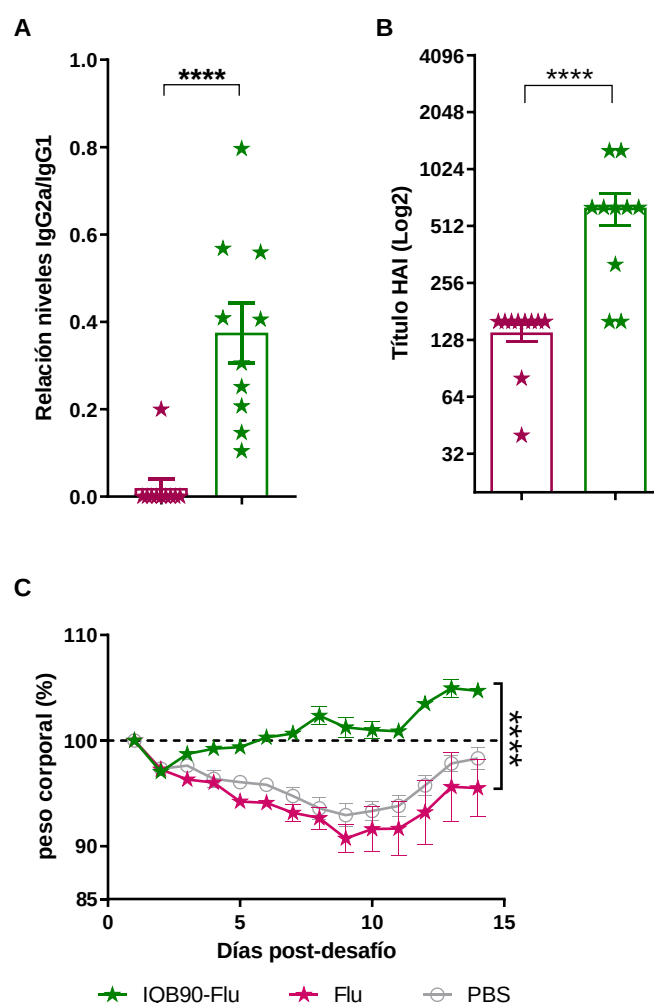


Figura 50. Perfil de la respuesta humoral, funcionalidad de anticuerpos y evolución del peso corporal frente al desafío subletal con influenza en la evaluación de la inoculación intranasal. Los animales fueron inoculados por vía i/n con IQB90-Flu (estrellas y barras verdes) con 7,5 $\mu\text{g}/\text{ds}$ de antígeno Flu; con 7,5 $\mu\text{g}/\text{ds}$ de antígeno Flu sin adyuvante

(estrellas y barras fucsia), o control negativo (inoculados con suero fisiológico por vía s/c, símbolos grises). Se muestra la relación de los niveles de anticuerpos séricos IgG2a/IgG1 al d28 (A) y los títulos de anticuerpos capaces de inhibir la hemaglutinación al d28 (B). Se muestra la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales ($n=8-10$). Para comparaciones entre 2 grupos se utilizó el test de Mann-Whitney, y el post-test de Dunn. 28 días luego del priming, fueron desafiadas con una dosis de 10^3 UFP del virus de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 por vía i/n. Los animales se observaron a diario durante 14 días para monitorear signos de enfermedad, la sobrevida, y el peso corporal. Se muestran los cambios en el peso corporal en porcentaje (media $\pm$ SEM), considerando como 100 % su peso el día previo al desafío (C). Los datos se analizaron mediante Two-way ANOVA y test LSD de Fisher, comparando a los grupos contra el grupo "Flu". En todos los casos **** indica $p < 0,0001$. Adaptado de Rivera-Patron et. al. 2021²⁸³.

4.3.2.4. Protección frente al desafío letal con el virus de influenza

Para evaluar la protección frente al desafío letal contra influenza se realizó un nuevo ensayo de vacunación y desafío en ratones hembra de la cepa BALB/c siguiendo el mismo esquema de vacunación y utilizando como antígeno Flu a la vacuna Vaxigrip® (Sanofi Pasteur), cepas 2018. En este ensayo, además de IMXQB90, Flu y PBS, se incluyeron nuevos grupos que fueron inoculados con formulaciones conteniendo saponinas nativas solubles QB90 QB80, o las nanoformulaciones de ésta (IMXQB80). También se inoculó un grupo con nanoformulaciones de la saponina comercial QuilA® (IMXQuilA®) como adyuvante. Como control, se incorporó un grupo que fue inoculado con IMXQB90 sin antígeno, para corroborar que el efecto observado es un efecto adyuvante, y que IMXQB90 no logra desencadenar una respuesta por si mismo. El esquema y las vías de inoculación se muestra en la Figura 51A. El desafío se realizó con 1×10^6 TCID₅₀ en 50 μ L de la cepa H1N1(pdm2009), por vía i/n. Luego del desafío los animales se monitorearon diariamente durante 14 días para evaluar signos de enfermedad (piloerección, pérdida de movilidad, sobrevida) y pérdida de peso. Los resultados fueron contundentes y consistentes con los resultados previos, tanto por vía i/n como por vía s/c.

En el caso de la inoculación por vía i/n, los inoculados con Flu (sin adyuvante) mostraron un marcado descenso del peso corporal, mientras que los animales inoculados con IMXQB90-Flu o IMX QB80-Flu mantuvieron su peso (Fig. 51B). Además, los ratones inoculados con las nanoformulaciones de saponinas nativas mostraron un 100 % de sobrevida, mientras que los inoculados sin adyuvante (Flu) mostraron una disminución contundente de ésta (Fig. 51D). Este resultado también se ve reflejado en la titulación viral de los pulmones al d5 post desafío. Los animales inoculados con adyuvantes nanoparticulados y el antígeno Flu mostraron títulos de carga viral menores a los animales inoculados sólo con el antígeno Flu por vía i/n (Fig. 51F).

En el caso de los grupos inoculados por vía s/c, se observa que los ratones control, inoculados con PBS o IMXQB90 sin antígeno, mostraron una marcada disminución de peso (Fig. 51C), y también de la sobrevida, al punto que en estos dos grupos ocurrió un 100 % de muerte al d7 y d9 post desafío respectivamente (Fig. 51E). Sin embargo, los ratones inoculados con formulaciones conteniendo adyuvantes y el antígeno Flu, así como el antígeno Flu solo, lograron mantener su peso entre el 90 y 100 %, aunque las curvas de peso de los animales inoculados con adyuvantes muestran diferencias significativas respecto a Flu (Fig. 51C). Aún así, todos los grupos inoculados con antígeno mostraron niveles muy altos de sobrevida (Fig. 51E). En el caso de la carga viral pulmonar al d5 post desafío, los animales vacunados con nanoformulaciones, ya sea de saponinas nativas (IMXQB90+Flu y IMXQB80+Flu) o de saponinas comerciales (IMXQuilA®+Flu), muestran menor carga viral que el grupo inoculado con Flu (Fig. 51G), mientras que los grupos inoculados con saponinas nativas solubles (QB90 y QB80) no mostraron diferencias respecto al grupo Flu (Fig. 51G). Por otra parte, todos los animales inoculados con

Flu, ya sea con SBA o Flu sin adyuvante mostraron una menor carga viral que los grupos inoculados sin antígeno (IMXQB90 solo y PBS) (Fig. 51G). Este resultado indica que la vacuna comercial sin adyuvante confiere protección (como era esperado), pero las formulaciones conteniendo IMX podrían ser una buena estrategia para disminuir la cantidad de antígeno necesaria por dosis (efecto *dose-sparing*).

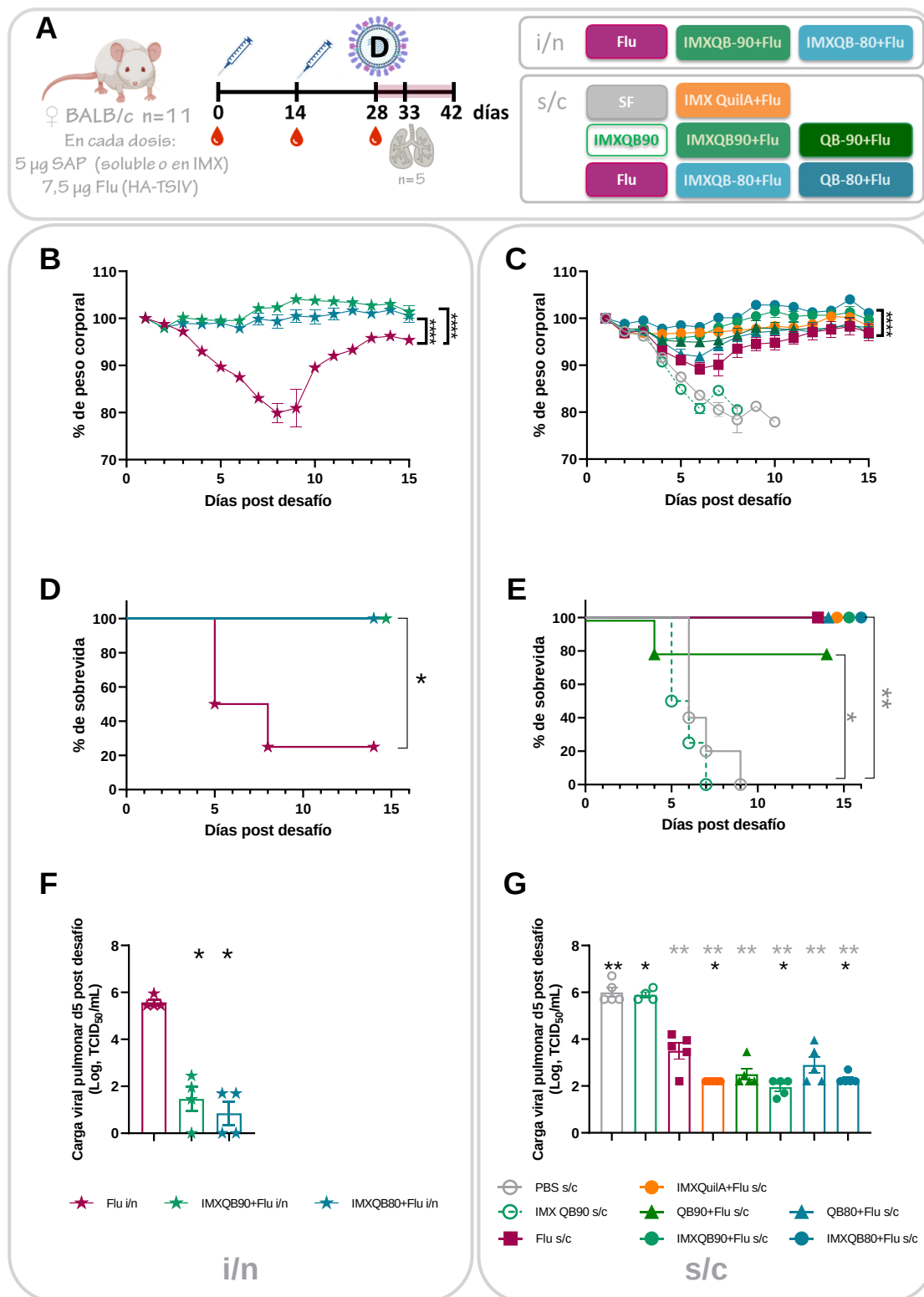


Figura 51. Protección de formulaciones conteniendo saponinas nativas frente al desafío letal de influenza. Ratones BALB/c hembras fueron vacunadas con 2 dosis (d0 y d14) de las distintas formulaciones según el esquema que se

muestra en A por vía i/n (B, D y F) o s/c (C, E y G). 28 días luego del priming, fueron desafiadas con una dosis de 1×10^6 TCID₅₀ en 50 μ L del virus de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 por vía i/n. Los animales se observaron a diario durante 14 días para monitorear signos de enfermedad, la sobrevida, y el peso corporal. Los cambios en el peso corporal se muestran en porcentaje (media $\pm$ SEM), considerando como 100 % su peso el día previo al desafío, de los ratones inoculados por vía i/n (B) y s/c (C). Se muestra la sobrevida luego del desafío (D & E). A los 5 días post desafío se hace la necropsia de 4-5 ratones por grupo, y se titula la carga viral pulmonar (F & G). Las gráficas muestran la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales ($n=4-5$). Los datos de la variación de peso corporal se analizaron mediante Two-way ANOVA y test LSD de Fisher, comparando a los grupos contra el grupo “Flu”. Los datos de sobrevida se analizaron mediante Log-rank (Mantel-Cox) test. Los datos de la carga viral se analizaron mediante el test de Mann-Whitney (cada grupo contra el grupo “Flu” se indica con asteriscos negros; comparación de grupos contra el grupo PBS se indica en asteriscos grises). * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$.

Para intentar correlacionar la respuesta humoral con los niveles de protección observados en los animales, a modo de ejemplo se muestran los niveles de anticuerpos de los algunos grupos inoculados por vía s/c al d28, previo al desafío (Fig 52). Los animales inoculados con SBAs por vía s/c mostraron mayores niveles de anticuerpos séricos IgGTotal (Fig. 52B), IgG1 (Fig. 52C), IgG2a (Fig. 52D), IgG2b (Fig. 52E) e IgG3 (Fig. 52F) que el grupo inoculado con Flu. Además, los animales inoculados con saponinas de *Q. brasiliensis* (tanto de forma soluble como nanoparticulada) mostraron una cinética de los niveles de anticuerpos IgGTotal similar a los animales inoculados con IMXQuilA® (Fig. 52G). En cuanto al perfil de la respuesta humoral desencadenada, evaluado mediante la relación de los niveles de anticuerpos IgG2a/IgG1 e IgG2b/IgG1, se observa, sin embargo, que los grupos inoculados con SBAs mostraron relaciones similares o menores al grupo inoculado con Flu, y por debajo de 1, indicando que el tipo de respuesta sería mixta polarizada hacia el fenotipo Th2 (Fig. 52H&I). No obstante, estos animales mostraron mejores niveles de protección luego del desafío, según se evidenció tanto a nivel del mantenimiento del peso corporal (Fig. 51C), como de la sobrevida (Fig. 51E), y de la carga viral en pulmón a los 5 días post desafío (Fig. 51G). En conjunto, estos resultados indican que la protección no estaría conferida por las subclases de los anticuerpos desencadenados en la respuesta humoral, sino por otras razones, por ejemplo, los niveles de anticuerpos desencadenados o los epítopes que reconozcan esos anticuerpos. Aunque se ha reportado que los anticuerpos de la subclase IgG2a contribuyen significativamente a la protección ya que inducen ADCC, y con ello contribuyen significativamente a la eliminación de células infectadas por influenza³⁸⁷, también se ha reportado que además del isotipo o subclase de los anticuerpos, los epítopes que reconozcan los anticuerpos pueden ser cruciales para lograr la activación de células efectoras del sistema inmune innato. Aunque el isotipo IgG pueda explicar parcialmente la habilidad de los anticuerpos en inducir funciones efectoras mediadas por la interacción de la región Fc con su receptor (Fc-Fc γ R), no explica por qué los anticuerpos con isotipos activadores idénticos difieren en su capacidad de inducir la activación de células innatas^{388,389}. En el caso de influenza se ha demostrado que los anticuerpos que reconocen el dominio del tallo de HA son capaces de activar la ADCC, mientras que los anticuerpos neutralizantes que se unen al dominio globular no. El mecanismo que subyace a esta “especificidad de epítope” es que la inducción de funciones efectoras contra influenza requiere no sólo de la interacción entre el anticuerpo (unido a su antígeno) con su FcR, sino también entre el dominio globular de la hemaglutinina y su receptor de la célula hospedera, el ácido siálico. En el caso de los anticuerpos que reconocen al dominio globular, impiden que éste sea reconocido por el ácido siálico, y de esta manera se impide la activación de la célula efectora³⁹⁰. Es interesante destacar que esta “doble interacción” es

requerida sólo para los FcγR de baja afinidad (tales como FcγR3A y FcγR2A en humanos), ya que los anticuerpos anti-dominio globular de HA pueden activar a las células efectoras a través de la unión con FcγR1³⁹¹. Por esta razón los anticuerpos anti-dominio globular de HA son capaces de activar funciones efectoras de células que expresan FcγR1, que en general son células fagocíticas (tales como neutrófilos, DCs, monocitos/macrófagos), pero no células NK³⁹². Entonces, sería interesante en el futuro poder optimizar estas vacunas, mediante su formulación no sólo con saponinas nativas como adyuvante, sino también utilizando epítopes específicos como antígeno, que al ser reconocidos por anticuerpos puedan activar de forma efectiva y eficiente a las células del sistema inmune innato, y logren mejor protección frente a una infección viral.

Por otra parte, sería interesante evaluar el perfil de citoquinas desencadenado frente al desafío por los distintos grupos, así como también evaluar la respuesta de células T, de manera de poder evaluar la respuesta inmune de manera más integral.

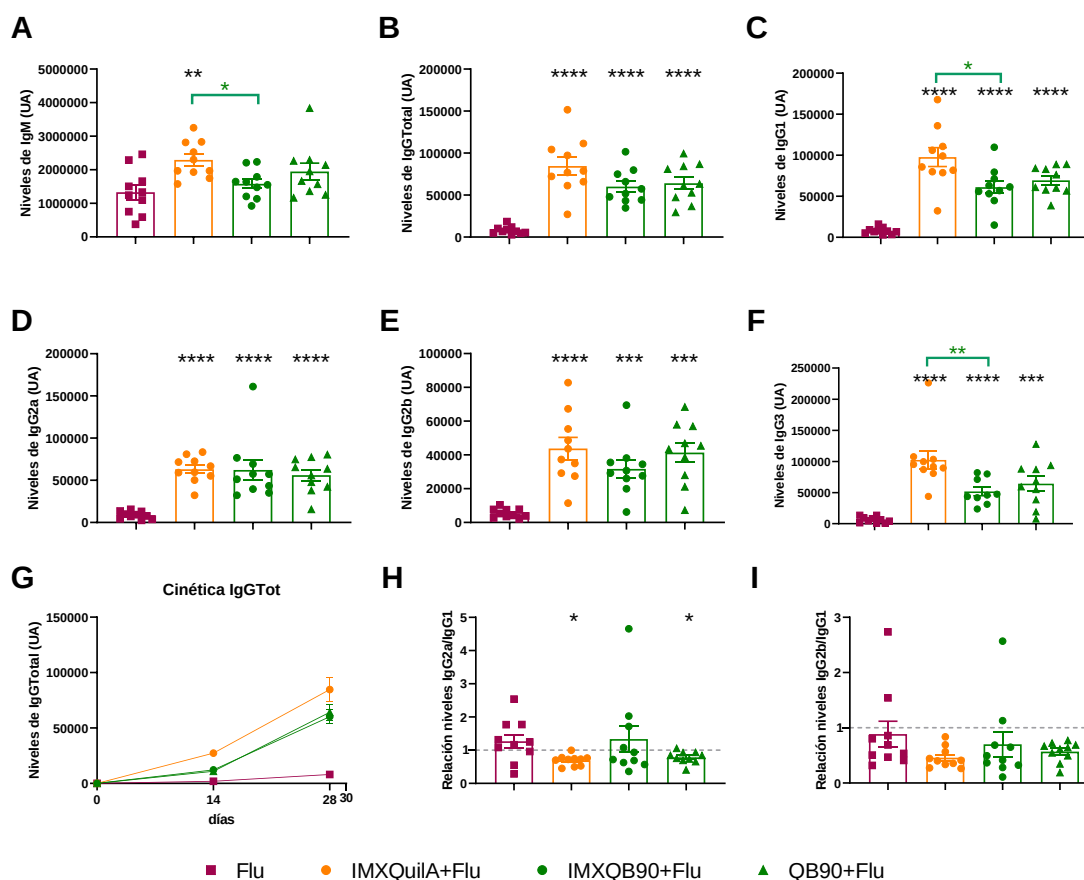


Figura 52. Respuesta humoral de ratones vacunados por vía s/c contra influenza al d28 previo al desafío. Las inmunizaciones por vía s/c se realizaron según el esquema de la Fig. 51A. Se muestran los niveles séricos de IgM (A), IgGTotal (B), IgG1 (C), IgG2a (D), IgG2b (E), e IgG3 (F) al d28 post priming. La cinética de los niveles de anticuerpos IgGTotal se muestra en G. Además, se muestra la relación de los niveles de IgG2a/IgG1 (H) y de IgG2b/IgG1 (I). Se muestra la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales. Los datos se analizaron mediante el test de Mann-Whitney (cada grupo contra el grupo "Flu" se indica con asteriscos negros). La comparación entre grupos conteniendo adyuvante se realizó por el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunn sin corrección, y se indica en asteriscos verdes. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$.

Para evaluar si esta protección puede variar según el sexo o la cepa de los ratones, se hicieron 2 experimentos adicionales, ambos con el mismo esquema de vacunación y desafío que en los

ensayos previos, y según se indica en Materiales & Métodos. En ambos ensayos los animales recibieron dos dosis (d0 y d14) de una de las siguientes formulaciones: IMXQB80+Flu, Flu (sin adyuvante) y PBS como control negativo por vía s/c. Al d28 post priming, los animales fueron desafiados por vía i/n con 1×10^6 TCID₅₀ en 50 μ L del virus de influenza tipo A cepa(H1N1)pdm2009.

Para evaluar si la protección variaba según el sexo de los animales se inocularon ratones machos y hembras de 6-8 semanas de edad cepa CD1. Se observa que los ratones tanto machos como hembras inoculados con IMXQB80+Flu lograron mantener su peso cercano al 100 % frente al desafío (Fig 53A&B). No obstante, en el caso de los animales inoculados con Flu, se observa que las hembras mostraron un mayor peso corporal, similar a las hembras inoculadas con IMXQB80+Flu (Fig 53A), mientras que los machos inoculados con Flu mostraron una gran disminución en el peso corporal, similar a los machos inoculados con PBS (Fig 53B). Sin embargo, al observar el porcentaje de sobrevida, en ambos sexos los animales inoculados con IMXQB80+Flu se comportan igual que los animales inoculados con Flu, y muestran altos porcentajes de sobrevida, mientras que los animales control (inoculados con PBS) muestran un porcentaje de sobrevida muy bajo (Fig 53C). Este resultado es coherente con lo reportado previamente en la literatura, donde se ha demostrado que la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, y ya sea frente a una infección o frente a la vacunación, presenta dimorfismo sexual e incluso entre géneros. Esto ha sido atribuido a varios factores, entre los que se incluyen diferencias fisiológicas y anatómicas que influyen la exposición, el reconocimiento, la eliminación e incluso la transmisión de microorganismos³⁹³. Estudios previos en humanos demuestran que, aunque los hombres son quienes reciben más vacunas, las mujeres son quienes generan mayores títulos de anticuerpos y sufren más cantidad de efectos adversos por la vacunación. Numerosos estudios realizados en humanos, animales, e *in vitro* han demostrado que existen varios factores inmunológicos, genéticos, epigenéticos, metabólicos, hormonales y ambientales que difieren entre los sexos, y contribuyen a distintas respuestas inmunes, tanto innatas como adaptativas frente a la vacunación³⁹⁴. En ratones se ha demostrado que las hembras son capaces de desencadenar mayores respuestas celulares (debido a una mayor respuesta de citoquinas proinflamatorias y a una mayor proliferación de células T), así como también mayores títulos de anticuerpos que los machos³⁹³. En el caso de la respuesta frente al desafío con el virus de influenza en modelo murino, se ha reportado que las hembras son capaces de desencadenar mayores respuestas humorales que los machos, y que esta respuesta es suficiente para conferir protección. Además se ha demostrado que este aumento en la producción de anticuerpos en las hembras está dado por cambios epigenéticos que derivan en una mayor expresión de TLR7 en las células B, logrando una mayor eficacia de la vacunación³⁹⁵.

Para evaluar la protección en ratones envejecidos y determinar si había diferencias en la protección entre distintas cepas de ratones con esta característica, se inocularon ratones hembras de 50-52 semanas de edad de las cepas C57Bl/6J y BALB/c. En el caso de la comparación en la protección entre las cepas BALB/c y C57Bl/6J de ratones envejecidos, se observa que los animales inoculados con IMXQB80+Flu mostraron un leve descenso del peso al inicio (Fig 53E&F), y un 100 % de sobrevida (Fig 53G&H) en ambas cepas, indicando que el adyuvante provoca una respuesta inmune que deriva en una mejor protección frente al desafío. No obstante, en el caso de los animales inoculados con Flu, los ratones BALB/c mostraron una respuesta similar a los ratones control (PBS), mientras que los ratones C57Bl/6J mostraron una

respuesta similar a los inoculados con IMXQB80+Flu, tanto en la variación de peso corporal (Fig 53E&F) como en la sobrevivencia (Fig 53G&H). Esto indica que los ratones C57Bl/6J fueron capaces de desencadenar una respuesta frente a la vacunación con Flu que fue más efectiva en conferir protección frente al desafío con el virus de influenza. Este resultado es coherente con lo reportado previamente en la literatura respecto a diferencias en la respuesta inmune entre distintas cepas de ratones endocriados para uso en experimentación. En particular entre estas dos cepas y su respuesta frente a la vacuna TIV, se ha demostrado que, aunque los ratones BALB/c desencadenaban una respuesta de IgG más robusta frente a los antígenos de influenza tipo A y mayor respuesta de linfoproliferación (tanto de células B como T) que los C57Bl/6J, los ratones BALB/c presentaban menor relación entre los niveles de IgG2a(c)/IgG1 que los C57Bl/6J. Además, al estudiar el perfil de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos, los ratones BALB/c producían mayores niveles de IL-4, mientras que los C57Bl/6J presentaban mayores niveles de IFN- γ . Estos datos indican que mientras los BALB/c generan una respuesta polarizada hacia Th2, los C57Bl/6J generan una respuesta polarizada hacia Th1, que es más eficiente en la protección frente a influenza³⁹⁶. Mas allá del tipo de respuesta que desencadenen las distintas cepas de ratones por su *background* genético, los SBAs logran sortear este sesgo y desencadenar protección en ambas cepas. Pero más relevante aún, los SBAs logran inducir respuestas protectoras en individuos envejecidos, incluso cuando tienen un *background* genético que presenta un sesgo a desencadenar respuestas de tipo Th2, y que no son capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora cuando son inoculados con la vacuna comercial contra influenza.

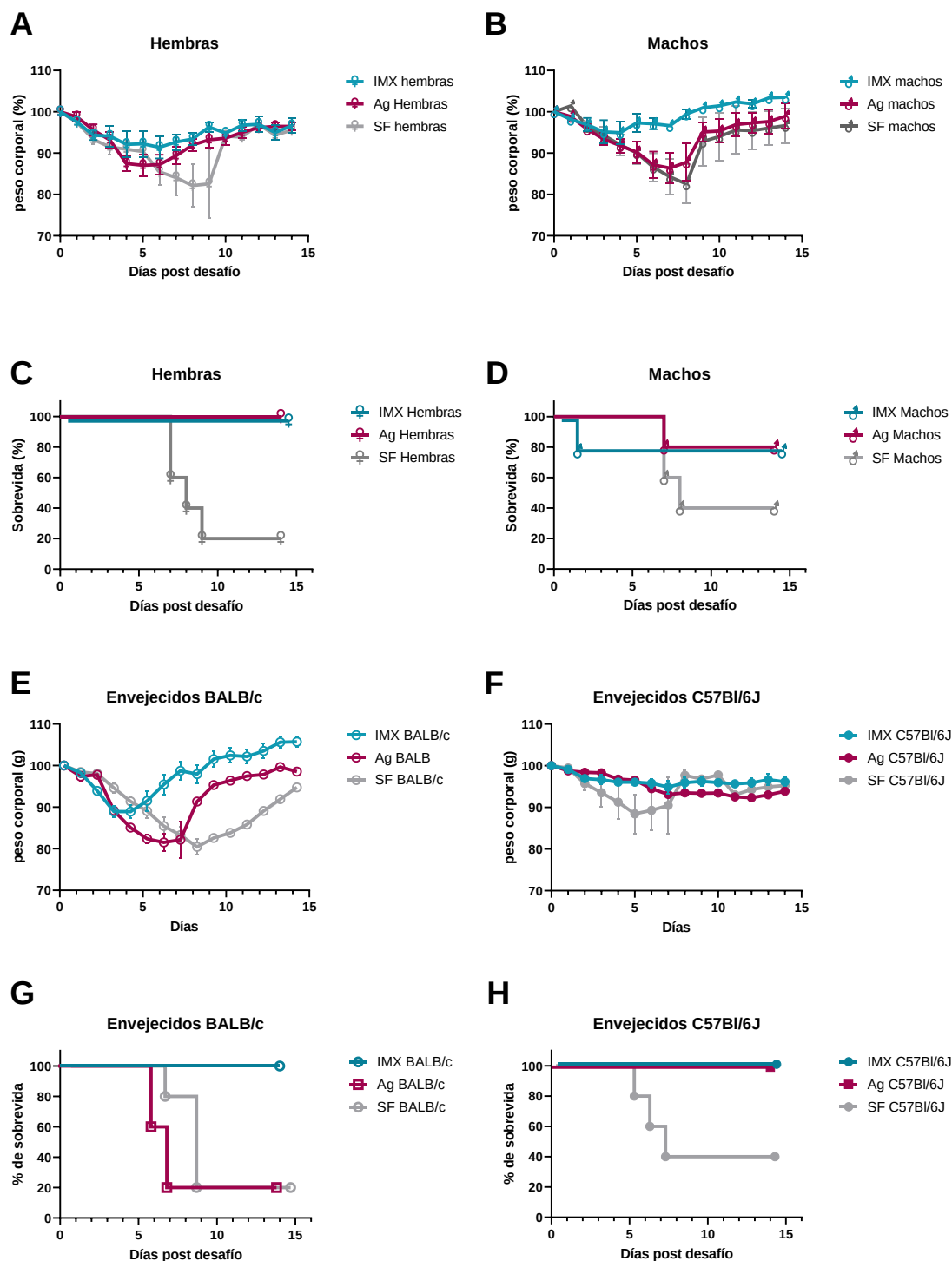


Figura 53. Protección de formulaciones conteniendo saponinas nativas frente a desafío letal de influenza en según el sexo, edad y cepa de los ratones. Los animales fueron vacunados con 2 dosis (d0 y d14) de IMXQB80+Flu, Flu sin adyuvante o SF como control negativo, por vía s/c. 28 días luego del priming, fueron desafiados con una dosis de 1×10^6 TCID₅₀ en 50 μ L del virus de influenza tipo A cepa (H1N1)pdm2009 por vía i/n. Los animales se observaron a diario durante 14 días para monitorear signos de enfermedad, la sobrevivida, y el peso corporal. Los cambios en el peso corporal se muestran en porcentaje (media $\pm$ SEM), considerando como 100 % su peso el día previo al desafío, para ratones cepa CD1 hembras (A), o machos (B) de 6-8 semanas de edad, y también para ratones hembra de 50-52 semanas de edad de la cepa BALB/c (E) o C57Bl/6J (D). Se muestra la sobrevivida luego del desafío para hembras (C) y machos (D) de 6-8 semanas de edad la cepa CD1, y para ratones hembra de 50-52 semanas de edad de la cepa BALB/c (G) y C57Bl/6J (H). Los datos de la variación de peso corporal se analizaron mediante Two-way ANOVA y test LSD de Fisher, comparando a los grupos contra el grupo "Flu". Los datos de sobrevivida se analizaron mediante Log-rank

(Mantel-Cox) test. Los datos de la carga viral se analizaron mediante el test de Mann-Whitney (cada grupo contra el grupo “Flu” se indica con asteriscos negros; comparación de grupos contra el grupo PBS se indica en asteriscos grises). * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$.

4.3.2.5. Rol de Casp 1/11 en la respuesta adaptativa frente a influenza

Varios adyuvantes ampliamente utilizados en vacunas licenciadas han sido identificados como activadores de inflammasomas. Previamente, en el marco de esta tesis hemos demostrado que IQB90 induce la producción de IL-1 β en BMDCs de una manera Caspasa 1/11 dependiente³⁰⁵. Por esta razón nos propusimos determinar si la respuesta inmune adaptativa desencadenada por adyuvantes basados en saponinas de *Q. brasiliensis* junto con el antígeno de influenza se ve disminuida en ratones *ko* para Caspasa 1/11 respecto a ratones *wt*. Para ello, realizamos un ensayo de vacunación en ratones C57Bl/6J *wt* y *ko* para Caspasa 1/11 según el esquema de vacunación para influenza (dos dosis, d0 y d14). Al igual que en animales *wt*, los animales *ko* para Caspasa 1/11 desarrollaron mayores títulos de IgGTotal (Fig. 54A), IgG1 (Fig. 54B), IgG2b (Fig. 54C), IgG2c (Fig. 54D) e IgG3 (Fig. 54E) cuando fueron inoculados con IQB90-Flu en comparación con Flu o con PBS (en estos últimos no se detectaron anticuerpos anti-influenza, datos no mostrados). No se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos entre los animales *ko* y *wt* inoculados con las mismas formulaciones (Fig. 54A, B & D), con la excepción de IgG2b, donde los animales *wt* inoculados con IQB90-Flu mostraron mayores niveles de anticuerpos que los *ko* (Fig. 54C). Además, al estudiar la relación entre los niveles de anticuerpos IgG2c/IgG1, se evidenció que los animales inoculados con IQB90-Flu mostraban mayor relación que los inoculados con Flu, y que esta relación era independiente de Caspasa 1/11 (Fig. 54E). Este resultado sugiere que IQB90-Flu desencadena una respuesta balanceada Th1/Th2 en ratones C57Bl/6J.

Además de los niveles de anticuerpos, se midió el número de ASC productoras de IgGTotal específicos contra influenza en bazo, mediante ELISpot, tal como se explica en Materiales & Métodos. No se encontraron diferencias en el número de ASC productoras de IgGTotal entre los animales *wt* y *ko* inoculados con las mismas formulaciones (Fig. 54F). Cabe mencionar que los animales inoculados con IQB90-Flu mostraron mayor número de ASC productoras de IgGTotal que los animales inoculados con Flu (Fig. 54F). Este resultado concuerda con los niveles de IgGTotal detectados en suero y analizados previamente. No obstante, una vez que el efecto del *booster* se desvanezca, se espera que el nivel de anticuerpos decaiga, pero que células productoras de anticuerpos específicos se mantengan, y frente a un nuevo encuentro con el antígeno o patógeno se activen para secretar anticuerpos. Por esta razón más adelante en este trabajo estudiaremos la frecuencia de ASC productoras de anticuerpos específicos anti influenza a tiempos más tardíos.

La respuesta celular se determinó mediante un ensayo de DTH en los ratones vacunados *wt* y *ko* al d28 post *priming*, tal como se explica en Materiales & Métodos. En la Figura 54G se muestran ambas patas de un ratón *wt* vacunado con IQB90-Flu, 24 horas post-inoculación i/d de antígeno, y la reacción de DTH desencadenada. Los animales vacunados con Flu no desencadenaron una reacción de DTH (Fig. 54H&I), al igual que los dos grupos de animales (*wt* y *ko*) vacunados con PBS (datos no mostrados). Sin embargo, los animales vacunados con IQB90-Flu mostraron una potente reacción de DTH a las 24 horas, tanto en el caso de los animales *wt* como en los animales *ko* para Caspasa 1/11 (Fig. 54H). No obstante, a las 48 horas de la inyección i/d, los animales *ko*

mostraron una menor reacción de DTH que los animales wt (Fig. 54I). Este resultado sugiere que el mecanismo que desencadena la reacción de DTH depende, al menos en parte, de Caspasa 1/11. Previamente, Wilson y colaboradores reportaron que nanopartículas ISCOMATRIX™ (formuladas con una fracción purificada de saponinas de *Q. saponaria*, CSL) activan el complejo inflammasoma NLRP3, para lo cual Caspasa-1 u 11 cumplen un rol fundamental¹⁵¹. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente por Detienne y colaboradores, cuando al evaluar la respuesta inmune desencadenada por QS-21 en liposomas, encontraron que Caspasa 1/11 estaba involucrada en la respuesta celular desencadenada por estas nanopartículas, pero no en la respuesta humoral³¹⁵. A pesar de que desencadenar una respuesta celular es crucial para combatir infecciones intracelulares, incluyendo las causadas por el virus de influenza, la mayoría de los adyuvantes utilizados en vacunas licenciadas fallan en inducir este tipo de respuestas. Por lo tanto, la inducción de este tipo de respuestas constituye un gran desafío en el desarrollo de nuevos adyuvantes de vacunas³⁹⁷. Se ha reportado que las saponinas comerciales, así como también los ISCOMs¹³³ y las saponinas de *Q. brasiliensis*³²⁷ son capaces de inducir este tipo de respuestas, aunque el mecanismo por el que ocurre aún debe ser elucidado. Los resultados aquí descritos demuestran la generación de una fuerte respuesta celular por parte de IQB90-Flu parcialmente dependiente de Caspasa 1/11.

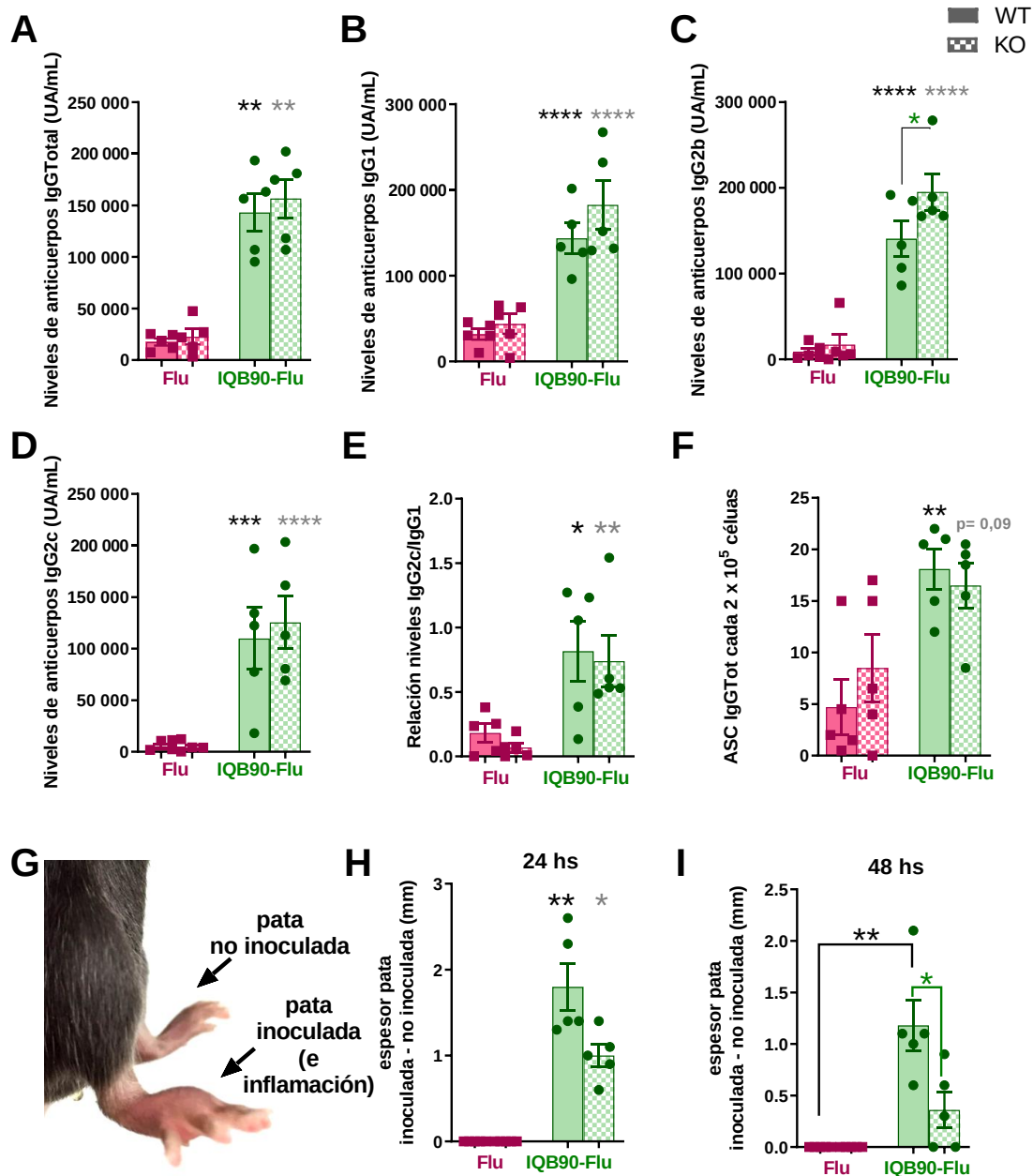


Figura 54. Respuesta humoral y celular en ratones wt y ko para Casp 1/11 inoculados con IQB90-Flu. Ratones hembra cepa C57Bl/6J wt o ko para Caspasa 1/11 fueron inoculados por vía s/c al d0 (priming) y al d14 (booster) con IQB90-Flu (barras verdes) o con la formulación sin adyuvantes (Flu, barras fucsias). Dos semanas después del booster (d28) se evaluó la respuesta humoral y celular. Los niveles de anticuerpos específicos anti-influenza IgGTotal (A), IgG1 (B), IgG2b (C), IgG2c (D) se midieron en suero al d28. La relación de los niveles de anticuerpos IgG2c/IgG1 se muestra en E. Al mismo tiempo (d28) se obtuvieron los esplenocitos aseptícamente, y se evaluó la frecuencia de ASC productoras de IgGTotal mediante ELISpot (F). Los resultados se expresan como número de ASC IgGTotal cada 2×10^5 esplenocitos. Para estudiar la respuesta CMI, dos semanas después del booster, a los ratones se les inoculó $0,75 \mu\text{g}$ del antígeno de influenza por vía intradérmica (i/d) en la almohadilla de la pata derecha. A las 24 (H) y 48 (I) se midió el espesor de la pata inoculada y de la pata no inoculada utilizando un calibre electrónico. La inflamación se calculó como la diferencia entre el espesor de la pata inoculada y el espesor de la pata no inoculada. A modo de ejemplo se muestran ambas patas de un individuo del grupo wt inoculado con IQB90-Flu 24 horas post-inoculación intradérmica (G). Como control adicional, se inocularon dos grupos de ratones (un grupo wt y otro ko para Caspasa 1/11) con PBS según el mismo esquema de vacunación (priming d0 y booster d14), y al d28 se les realizó el ensayo de DTH con antígeno Flu tal cual fue explicado previamente. No se detectó inflamación en estos grupos (la diferencia entre las

patas fue cero para cada animal de los dos grupos inoculados con PBS, a las 24 y 48 hs post-inoculación i/d, datos no mostrados). Se muestran los valores individuales y la media $\pm$ SEM de cada grupo ($n=5$ para A-F y $n=3$ para G-I). Los datos se analizaron mediante two-way ANOVA y post test de Fisher para comparar entre los grupos wt y ko (asteriscos verdes) y mediante el test de Kruskal-Wallis y el test de Dunn sin corrección para comparar cada grupo contra el grupo sin adyuvantes (Flu) (asteriscos negros para comparación entre grupos wt, asteriscos grises para comparación entre grupos ko). *indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ y **** indica $p < 0,0001$). Adaptado de Rivera-Patron et. al. 2021²⁸³.

4.3.2.6. Inmunidad frente a influenza a largo plazo

Con el fin de estudiar si la respuesta inmune contra influenza desencadenada por las formulaciones conteniendo QB90, ya sea en forma soluble o en nanopartículas tipo IMX, se mantiene a largo plazo y si es similar a la respuesta desencadenada por las saponinas comerciales, se realizó un nuevo ensayo de vacunación en ratones cepa C57Bl/6J de 6-8 semanas de edad según el esquema de la Fig. 55A. A partir de este ensayo se midieron los niveles de anticuerpos anti-influenza en suero IgGTotal, IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 cada 14 días, hasta el d60 inclusive y se evaluó la respuesta de células B de memoria mediante ELISpot, de células T de memoria mediante citometría de flujo, y la linfoproliferación antígeno-específica a tiempo final (d60).

Todos los grupos inoculados con formulaciones conteniendo adyuvantes mostraron mayor respuesta humoral que el grupo inoculado sin adyuvantes (Flu), a lo largo de todo el ensayo, y esta diferencia se mantiene hasta el máximo tiempo medido, al d60 (Fig 55B-G). QB90 mostró niveles comparables a QuilA[®] para IgGTotal y las subclases de IgG, y en la relación de niveles IgG2c/IgG1. Al comparar las nanoformulaciones, IMXQuilA[®] mostró mayores niveles de IgG2b que IMXQB90 (Fig 55D) a tiempos tardíos. Asimismo, al comparar entre las formulaciones de *Q. brasiliensis*, QB90 mostró una mayor relación de IgG2c/IgG1 que IMXQB90 al día 60 (Fig 55G), sugiriendo que en este caso la forma soluble fue capaz de promover una respuesta tardía más polarizada hacia Th1 que IMXQB90.

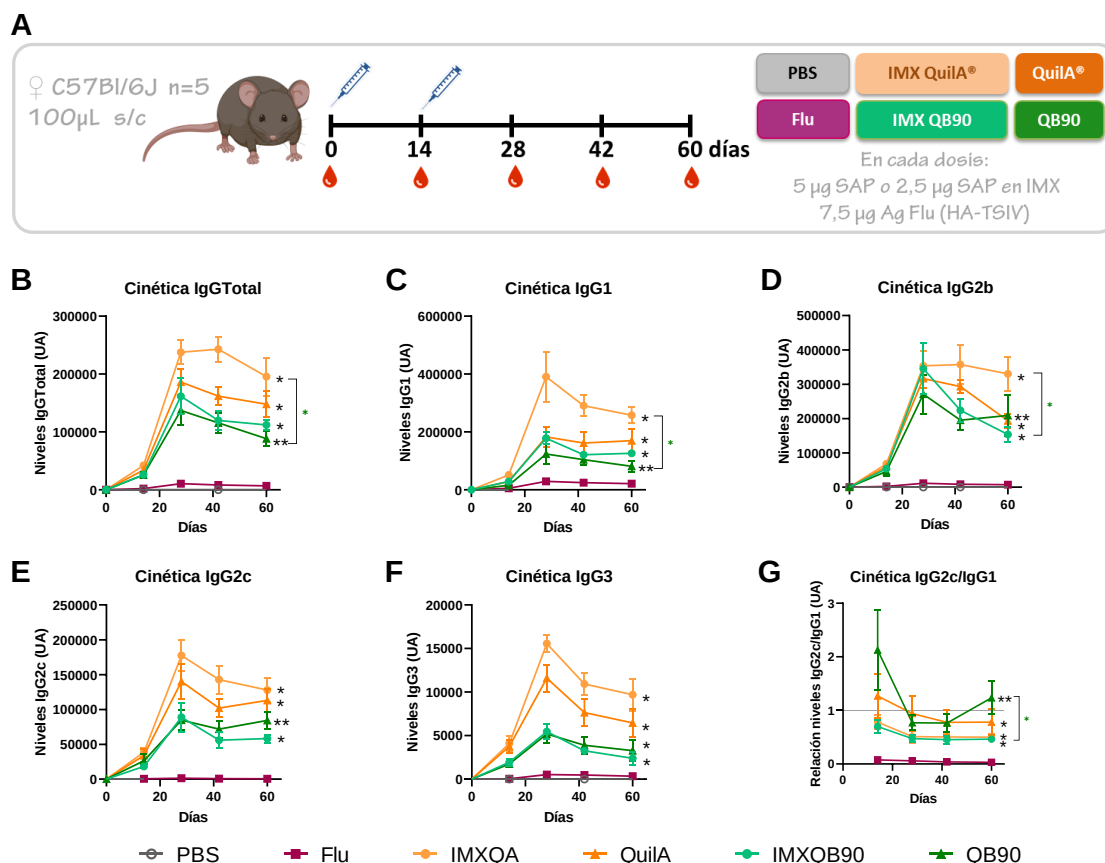


Figura 55. Ensayo de vacunación subcutánea contra influenza a largo plazo. Esquema de vacunación (A). Los ratones hembra cepa C57Bl/6J recibieron 2 dosis (priming d0 y booster d14) por vía s/c de una formulación con el antígeno de influenza (Sanofi Vaxigrip, 7,5 µg de HA/ds) conteniendo como adyuvante IMXQB90 (círculos verdes), IMXQuilA® (círculos naranjas), QB90 (triángulos verdes) o QuilA® (triángulos naranjas), que contenían 5 µg de saponinas, o antígeno de influenza sin adyuvante ("Flu", cuadrados fucsias). Como control se inoculó un grupo con PBS (círculos vacíos grises). Se muestra la cinética de los niveles de anticuerpos séricos específicos anti-influenza IgGTotal (B), IgG1 (C), IgG2b (D), IgG2c (E), IgG3 (F) y la relación de los niveles IgG2c/IgG1 (G) a lo largo de todo el ensayo. Se muestra la media $\pm$ SEM de cada grupo, y los valores individuales (n=4-5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo respecto al grupo Flu al d60 post priming en asteriscos negros. En asteriscos verdes se muestra las diferencias entre dos grupos conteniendo SBAs (indicados por la lleve recta) al d60. * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$. En asteriscos negros se muestran los resultados de la comparación cada grupo respecto a Flu mediante el test de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos conteniendo SBAs se analizaron mediante el tes de Kruskal-Wallis y post test de Dunn, y se indican en asteriscos verdes.

Al estudiar las ASC anti influenza obtenidas del bazo al d60, se observa que los animales vacunados con SBAs mostraron una mayor frecuencia de ASC IgGTotal (Fig 56A), IgG1 (Fig 56B), e IgG2c (Fig 56C) que el grupo inoculado con Flu. Además, todos los grupos inoculados con SBAs mostraron una mayor relación de la frecuencia de ASC IgG2c/IgG1 que Flu (Fig 56D). No se encontraron diferencias entre los grupos inoculados con adyuvantes. Estos resultados indican que QB90 tanto en forma soluble como en nanopartículas tipo IMX fue capaz de desencadenar una respuesta de células B de memoria comparable a la desencadenada por la saponina comercial QuilA® o sus IMX. Respecto a la proliferación de linfocitos T CD8⁺, los dos grupos inoculados con saponinas de *Q. brasiliensis* o con QuilA® mostraron mayores índices de proliferación (IP) antígeno específica que Flu, pero no así el grupo inoculado con IMXQuilA® (Fig 56E). Además, QB90 fue el único grupo que mostró un mayor IP antígeno-específico de los linfocitos T CD4⁺ que Flu (Fig 56F). No obstante, sería recomendable repetir este ensayo

umentando el número de animales por grupo, ya que, aunque los datos son estadísticamente significativos, la variación entre grupos es muy ajustada. Este resultado, junto al resultado previo respecto a las células B de memoria, indica que las saponinas de *Q. brasiliensis*, son capaces de promover una buena respuesta de células B y T duradera en el tiempo, y más robusta que la desencadenada por la vacuna comercial y por la formulación conteniendo la saponina comercial QuilA®.

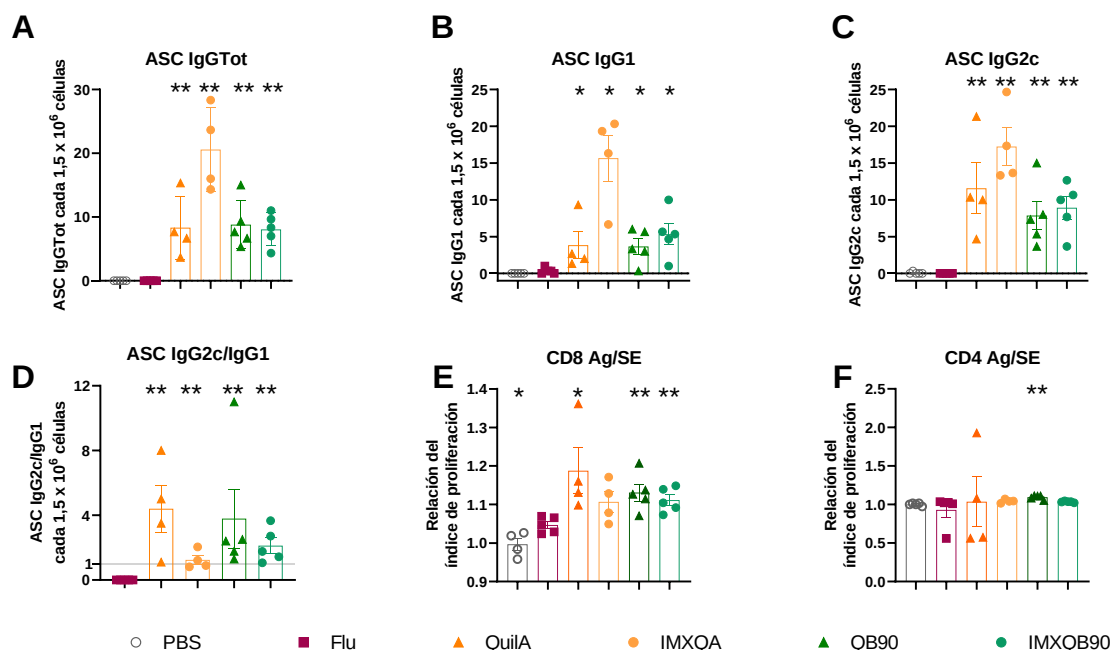


Figura 56. Respuesta celular específica contra influenza a largo plazo. Se obtuvieron los esplenocitos de los animales vacunados a los 60 días post-priming y se determinó la frecuencia de células productoras de anticuerpos (ASC) IgGTot (A), IgG1 (B) e IgG2c (C) específicos anti-influenza mediante ELISpot. Relación de la frecuencia de ASC productoras de IgG2c/IgG1 (D). Por otra parte, los esplenocitos se tiñeron con CFSE y se estimularon in vitro durante 72 hs con 5 µg/mL o sin estímulo. Transcurridas 72 hs, las células se marcaron con anticuerpos de superficie para identificar células T CD8⁺ y T CD4⁺ por citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante el programa ModFit LT V5.0.9(Win). Se muestran las relaciones de los índices de proliferación con antígeno Flu en función de la proliferación basal (sin estimular, SE) de los linfocitos T CD8⁺ (E) y T CD4⁺ (F). Se muestra la media ± SEM de cada grupo y los valores individuales (n=5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo respecto al grupo Flu al d60 post priming en asteriscos negros. * indica p < 0,05 y ** indica p < 0,01 mediante el test de Mann-Whitney.

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre grupos en las células T CD8⁺ y CD4⁺ efectoras, efectoras de memoria ni en las centrales de memoria (Fig. 57). Dados los resultados detectados previamente al evaluar la respuesta antígeno-específica de células B y T, el no haber encontrado diferencias en este caso podría deberse a que no se están detectando las células T efectoras, efectoras de memoria o centrales de memoria antígeno-específicas, sino estas subpoblaciones células T a nivel general, por lo que es coherente que no se encuentren diferencias a nivel general. Sería interesante poder detectar estas subpoblaciones de células T antígeno-específicas, utilizando para ello tetrámeros o multímeros de MHC-I o MHC-II antígeno-específicos.

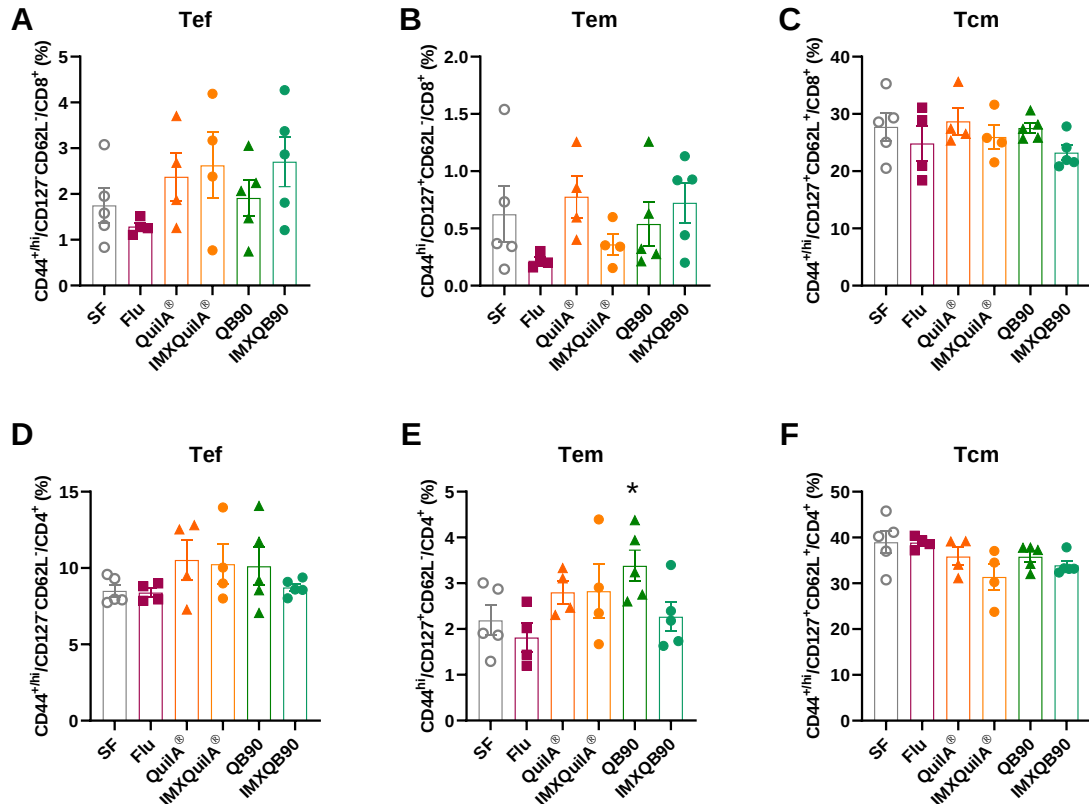


Figura 57. Respuesta de células T de memoria a largo plazo. Se obtuvieron los esplenocitos de los animales vacunados a los 60 días post-priming y se determinó el porcentaje de células T efectoras (Tef CD44^{hi}/CD127⁺CD62L⁻ A&D), T efectoras de memoria (Tem CD44^{hi}/CD127⁺CD62L⁻ B&E), y de T centrales de memoria (Tcm CD44^{hi}/CD127⁺CD62L⁺ C&F) sobre el total de células TCD8⁺ (A-C) y TCD4⁺ (D-F), mediante citometría de flujo. Se muestra la media ± SEM de cada grupo y los valores individuales (n=4-5). Se indican las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo respecto al grupo Flu en asteriscos negros. * indica p < 0,05 y ** indica p < 0,01 mediante el test de Mann-Whitney.

A partir de todos estos ensayos utilizando el antígeno de influenza en modelo murino en formulaciones con SBAs de *Q. brasiliensis*, se pudo evidenciar que los SBAs de *Q. brasiliensis* son capaces de promover una potente respuesta de células T y B, balanceada entre los fenotipos Th1/Th2 en ratones con distintas características: distintas cepas, distinto sexo, ratones adultos jóvenes y envejecidos, y que dicha respuesta es capaz de conferir protección frente al desafío letal con el virus de influenza. Además, se demostró que estos adyuvantes confieren efecto *dose-sparing*, permitiendo una reducción de al menos hasta 10 veces en la cantidad de antígeno por dosis vacunal. Esta característica hace que estos adyuvantes puedan ser utilizados en situaciones de pandemia, donde se necesita una gran cantidad de dosis de vacunas para cubrir a toda la población. En particular, el virus de influenza tiene grandes probabilidades de generar cepas que causen pandemias, debido a su alta capacidad de mutación por deriva antigénica de su genoma de ARN (*antigenic drift*), y también por salto antigénico (*antigenic shift*) debido a la segmentación de éste y al intercambio de fragmentos génicos entre diferentes cepas de virus de influenza tipo A cuando infectan la misma célula, y porque además tienen un amplio reservorio en distintas especies animales. Aunque el modelo de ratón no es el ideal para el trabajo con el virus de influenza, debido a que estos animales carecen de los residuos de ácido siálico, que son las moléculas que interaccionan con la hemaglutinina viral, y de esta manera el virus infecta las células del hospedero, en este trabajo pudimos demostrar que los ratones son

susceptibles a este virus. El trabajo con estos animales es relativamente fácil y de bajo costo, y en particular para la realización de esta tesis se contaba con las instalaciones y reactivos necesarios para ello. Estos resultados, permiten poder continuar estudiando el potencial de estos adyuvantes ya en modelos mas específicos para influenza, pero también mas costosos, como por ejemplo el hurón.

5. Conclusiones & Perspectivas

En este trabajo se logró producir fracciones conteniendo saponinas a partir de extractos foliares de *Q. brasiliensis*, y trabajar con ellas para estudiar su capacidad adyuvante, tanto de forma soluble como en NPs tipo ISCOMs o IMX. Además, se diseñó y formuló un nuevo sistema de adyuvantes que consiste en la formulación de estas NPs con el agregado de extractos etanólicos de propóleos producidos por *A. mellifera* obtenidos de colmenas del Depto. de Soriano, Uruguay, y al que denominamos ISCOMPro. Las formulaciones de trabajo presentan la ventaja de que son formuladas a partir de extractos vegetales, sintéticos, o producidos por animales no mamíferos (insectos, en el caso de los propóleos). El uso de este tipo de materiales es una gran ventaja para los productos biológicos farmacéuticos, ya que evitan la posibilidad de transmisión de enfermedades tales como la encefalopatía espongiforme bovina (BSE). La caracterización estructural exhaustiva de las fracciones de saponinas con las que se trabajó escapaba a los cometidos de esta tesis. No obstante, se realizó una caracterización preliminar mediante MALDI-TOF-MS, comparando las fracciones de trabajo con la fracción QuilA®, utilizada comercialmente, y cuya caracterización ha sido objeto de estudio de grupos de investigadores dedicados a la elucidación estructural de compuestos orgánicos complejos. En este sentido, evidenciamos que las fracciones de trabajo presentan cierta similitud en la composición de los sustituyentes del grupo aglicona, como de los sustituyentes hidrofílicos. Con las fracciones de *Q. brasiliensis* se logró formular las NPs tipo ISCOM, ISCOMPro, o IMX, IMXPro, en presencia de diferentes antígenos, o en ausencia de ellos respectivamente, de tamaño y forma adecuadas: estructura tipo caja de aproximadamente 40 nm, tal como fuera visualizado mediante HR-MET o MET y como fuera evidenciado a nivel de la formulación mediante DLS. Aunque las NPs formuladas presentaban un valor de potencial Z no muy alto (-7 a -15 mV), lo que podría derivar en que las partículas se auto-agregaran y disminuyera su estabilidad en el tiempo, las nanoformulaciones mostraron bajos índices de polidispersidad (menores a 0,3), lo que demuestra que son formulaciones que tienden a ser estables en el tiempo. No obstante, sería interesante hacer estudios de estabilidad de las diferentes formulaciones periódicamente durante al menos 2 años. Se ha reportado que las NPs tipo ISCOM o IMX formuladas con saponinas de *Q. saponaria* tienen una estabilidad de al menos 2 años si se mantienen refrigeradas (2-8 °C), que resisten el congelamiento e incluso a múltiples rondas de congelado y descongelado, y son estables hasta 1 mes si se almacenan a 37 °C³⁰³. Estas características las hacen muy ventajosas si se pensara en incorporarlas a vacunas que luego deben ser transportadas largas distancias desde su sitio de formulación hasta el usuario final, que muchas veces se encuentra en poblaciones de difícil acceso. Además, son resistentes a distintos pHs, y pueden ser combinadas mediante una mezcla simple previo a la inoculación con antígenos de diferentes características (hidrofílicos, hidrofóbicos, con diferente punto isoelectrico)¹⁴⁴. Esta particularidad también resulta muy ventajosa ya que muchas veces la combinación de un antígeno con un adyuvante requiere de procesos químicos complejos y costosos, dificultando que se logre la formulación final adecuadamente y a un costo razonable que pueda ser cubierto por países de bajos recursos. No obstante, se podría optimizar aún más las formulaciones de trabajo para lograr partículas más homogéneas (disminuir aún más el PDI), mediante técnicas como la ultracentrifugación en gradiente de densidad, o la extrusión molecular. Es importante considerar que, de aplicarse estos métodos, luego, para utilizar estos adyuvantes a gran escala, se debería realizar el escalado de los mismos. Aunque se garantizaría mayor homogeneidad entre lotes, podría suponer el agregado de complejidad y costos a la formulación.

En términos de la capacidad de estimulación del sistema inmune innato por parte de los SBAs, se logró demostrar que tanto las saponinas de *Q. brasiliensis* en forma soluble como en NPs tipo

IMX logran el reclutamiento de granulocitos y linfocitos al dLN y al bazo a tiempos tempranos (6 y 24 horas post inoculación). Cabe mencionar que, a nivel de poblaciones particulares, las diferencias no fueron contundentes. Además, es importante destacar que, si bien se estudiaron las poblaciones leucocitarias y linfocitarias generales o mayoritarias, tales como monocitos, macrófagos, DCs, NKs, linfocitos B, T CD4⁺ y T CD8⁺, quedó pendiente el estudio de otras subpoblaciones tales como DCs foliculares, linfocitos innatos, y células NKTs, que podrían ser activadas por estos adyuvantes, así como también distintos estados de diferenciación y/o activación. No obstante, en este trabajo se estudió por primera vez el efecto de los SBAs de *Q. brasiliensis* sobre la subpoblación de macrófagos CD169⁺ en dLN y bazo. Aunque no se encontraron diferencias respecto al grupo control, sí se detectó la presencia de esta subpoblación celular. Previamente se ha reportado que esta subpoblación de macrófagos CD169⁺ residentes del dLN jugarían un rol preponderante en la capacidad adyuvante de QS-21³¹⁵, por lo tanto, el haber detectado la presencia de esta subpoblación es un resultado muy auspicioso. Respecto a la funcionalidad de las células del sistema inmune innato al ser estimuladas *in vitro* con los SBAs de *Q. brasiliensis*, en este trabajo se evidenció que los macrófagos murinos de la línea celular J774 A.1 producían óxido nítrico, sugiriendo su activación hacia el fenotipo proinflamatorio M1. Aunque este resultado es alentador, es importante considerar que estudios previos han reportado diferencias en la respuesta entre macrófagos primarios y esta línea celular, por ejemplo, frente a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, en donde se ha demostrado que los macrófagos primarios responden con mayor rapidez e intensidad que los macrófagos de esta línea celular, en términos de número de genes expresados diferencialmente y en la magnitud de la inducción o represión³⁹⁸. Aun así, estos resultados son alentadores, y concuerdan con la potente respuesta inflamatoria que se ha reportado extensamente para los SBAs de saponinas comerciales. En cuanto a la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos y BMDCs, se evidenció que los SBAs, tanto de forma soluble como nanoparticulada, promueven un aumento de la expresión o del porcentaje de APCs que expresan estas moléculas, particularmente de la molécula co-estimuladora CD86. Además, se evidenció que las BMDCs estimuladas con SBAs de *Q. brasiliensis*, eran capaces de promover una mayor internalización y procesamiento antigénico del antígeno DQ-OVA, indicando una mayor actividad por parte de éstas en presencia de SBAs de *Q. brasiliensis* que en ausencia de éstos. También se evidenció que en presencia de una segunda señal, como LPS, las BMDCs producían IL-1 β de una manera dependiente de Caspasa 1/11, indicando la activación del complejo inflammasoma. Debido a la dificultad técnica de que los ratones KO para Caspasa 1 también lo son para Caspasa 11, en este trabajo no se pudo determinar si se estaría activando un complejo inflammasoma canónico o uno no canónico. Sin embargo, los mecanismos descritos para la activación de los inflammasomas canónicos, indican que sería Caspasa 1 quien sería la responsable del clivaje de la Pro-IL-1 β a IL-1 β , y que la activación del inflammasoma no-canónico, que deriva en la activación de Caspasa 11, no clivaría a esta pro-enzima, sino que directamente clivaría al fragmento N-terminal de Gasdermina (GSDMD), y así se generaría el poro que derivaría en apoptosis pro-inflamatoria denominada piroptosis. En este trabajo, hemos detectado la liberación especies reactivas del oxígeno (tal como óxido nítrico) por parte de macrófagos en presencia de los SBAs de *Q. brasiliensis*, y la producción de IL-1 β en BMDCs de manera dependiente de Caspasa 1 y 11. Si a esto le agregamos que se ha reportado que los adyuvantes particulados, y otros adyuvantes tales como las sales de aluminio, MF59, AS01 al 04, y, particularmente QS-21, ISCOMS e IMX formulados con saponinas de *Q. saponaria* serían capaces de activar el complejo inflammasoma canónico NLRP3, no sería raro pensar que este complejo inflammasoma también fuera activado por los SBAs de *Q. brasiliensis*, dadas las similitudes estructurales y funcionales que hemos evidenciado. Sin embargo, tampoco se podría

descartar que los SBAs de *Q. brasiliensis* (y también los de *Q. saponaria*) activen al complejo inflammasoma no-canónico, dado que éste se activa también por la presencia de la oxidación de lípidos de la membrana celular ocasionada por el daño tisular³⁹⁹, más aún si se considera que la capacidad adyuvante de estos compuestos no radica en una acción concreta, sino en estimular a los mecanismos del sistema inmune por diferentes vías, como ha sido ampliamente comprobado y argumentado^{160,400,401}. En este sentido, es importante destacar que en este trabajo no se abordó el estudio de los cambios inducidos por los SBAs de *Q. brasiliensis* a nivel del sistema del complemento. Por otro lado, dada la evidencia de activación de diversas funciones de las células del sistema inmune innato, sería interesante estudiar los cambios a nivel epigenético inducidos por los SBAs de *Q. brasiliensis*, que derivarían en la generación de inmunidad entrenada, posibilitando una respuesta inmune más potente frente al antígeno vacunal o frente a un antígeno no-relacionado éste, y por lo tanto muy beneficioso para el individuo vacunado⁴⁰². En este sentido, se ha reportado que distintas nanopartículas, tanto endógenas como exógenas tienen capacidad de promover cambios epigenéticos en las células del sistema inmune innato, principalmente en monocitos, que derivan en cambios en la respuesta de estas células a diversos antígenos a largo plazo⁴⁰³. Además, resta estudiar los efectos sobre la inmunidad innata del novedoso sistema de adyuvantes ISCOMPro que hemos diseñado.

En términos de la respuesta adaptativa inducida por los SBAs de *Q. brasiliensis*, a pesar de la variabilidad entre fracciones, y de antígenos con los que se trabajó, y de no haber podido identificar mecanismos particulares en la activación de la respuesta inmune innata, en este trabajo comprobamos que los adyuvantes estudiados son potentes activadores de una respuesta adaptativa balanceada entre los fenotipos Th1/Th2. Este resultado refuerza aún más la hipótesis de que no es por la activación de mecanismos puntuales de la respuesta inmune innata, sino por la sumatoria de múltiples estímulos leves en simultáneo que estos adyuvantes logran la potente estimulación del sistema inmune adaptativo. Para ello, trabajamos en el modelo de ratón con dos antígenos muy diferentes: un antígeno parasitario, de *Fasciola hepatica*, y otro antígeno viral, de Influenza. En ambos casos se logró evidenciar una potente respuesta inmune antígeno-específica, y además al realizar ensayos de desafío, se logró demostrar que las formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis* conferían una mejor protección frente a la infección que las formulaciones sin adyuvante.

En el caso de Influenza se estudió el efecto adyuvante de estos compuestos cuando eran inoculados por vía parenteral, pero también por vía intranasal, y se evidenció que estos adyuvantes son buenos inductores de la inmunidad de mucosas. Aunque quedó pendiente la inoculación por vía intragástrica para el modelo de *F. hepatica*, estudios previos con ISCOMATRIX de *Q. saponaria*, demostraron que esos adyuvantes son potentes estimulantes de la inmunidad de la mucosa intestinal³⁰³. La inducción de la inmunidad de mucosas es un desafío actual en el desarrollo de vacunas potentes y eficaces, ya que estos tejidos han evolucionado para ser tolerantes frente a antígenos extraños para que los organismos puedan nutrirse y obtener oxígeno para respirar. Sin embargo desencadenar potentes respuestas en la vía de entrada de patógenos entéricos o respiratorios, es crucial para evitar no solo la enfermedad, sino la infección de los individuos, y con ella cortar la transmisión de los patógenos⁴⁰⁴. Por esta razón, sería interesante continuar explorando la inmunidad de mucosas generada por los SBAs de *Q. brasiliensis*. Además, se estudiaron las diferencias en la respuesta de ratones de distinto sexo, en ratones envejecidos, y en distintas cepas de éstos, corroborando el potencial de los SBAs de *Q. brasiliensis* indiferentemente de la cepa, sexo y edad de los ratones. También se evaluó la respuesta a corto y largo plazo (60 días), evidenciando que la respuesta inmune

desencadenada es duradera en el tiempo. Por otra parte, si bien se estudió la respuesta inmune tanto humoral como celular, sería interesante en el futuro poder caracterizar mejor la respuesta celular desencadenada. Para ello se podrían utilizar herramientas que permitan la identificación de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicas, tales como tetrámeros o multímeros de MHC-I y MHC-II confeccionados para los antígenos de trabajo. Además, quedó pendiente la caracterización de la polifuncionalidad de las células T inducidas por la vacunación con formulaciones conteniendo SBAs de *Q. brasiliensis*, tal como ha sido demostrado para otras saponinas de uso comercial¹⁵⁰.

A pesar de que los modelos utilizados no eran los ideales en ninguno de los dos casos, ya que para *F. hepática* lo ideal hubiera sido utilizar rumiantes, y en el caso de Influenza, el modelo animal por excelencia es el hurón, debido a que las células del epitelio pulmonar de estos animales presentan residuos de ácido siálico, y mediante estos interactúan con la hemaglutinina del virus de influenza. El haber obtenido estos resultados en modelo murino brinda una buena base de evidencia para poder avanzar hacia estudios con modelos más específicos para cada infección, pero también más costosos y con los que es más difícil trabajar por su tamaño, costo, y por los requerimientos de instalaciones y de reactivos específicos. Además, permite ir avanzando hacia lograr probar estos novedosos adyuvantes a nivel clínico. Estudios previos con vacunas conteniendo ISCOMs o ISCOMATRIX™ formulados con saponinas de *Q. saponaria* (QS-21 o ISCOPREP) demostraron que estos adyuvantes son seguros y capaces de promover potentes respuestas humorales y celulares en humanos^{112,290,405}.

Los resultados fueron contundentes y permiten inferir que estos adyuvantes podrían ser utilizados en combinación con una amplia gama de antígenos, tanto para salud animal como para salud humana, y también que la respuesta inmune desencadenada es duradera en el tiempo. Sin embargo, una limitante que presentan estos adyuvantes es su escasez y la dificultad para su obtención. Debido a la alta demanda, la deforestación de los árboles de *Q. saponaria* comenzó a aumentar drásticamente, lo que llevó al gobierno chileno a decretar estrictas reglas para el uso de estos recursos, y evitar el uso masivo y destructivo de los árboles. Por esta razón, la obtención de las saponinas a partir de los extractos foliares, como los SBAs utilizados en esta tesis, podría ser una fuente de saponinas de mayor sostenibilidad, que permitiría preservar a los árboles luego de obtener las saponinas, y disminuir el tiempo de recuperación de los mismos.

Por otra última, además de evaluar la respuesta mediante la identificación de mediadores puntuales de la inmunidad adaptativa, sería interesante estudiar el efecto de estos adyuvantes mediante vacunología de sistemas, para evitar sesgos y lograr evaluar los cambios globales a nivel de transcriptómica, miRNómica, proteómica, epigenómica, lipidómica y metabolómica^{160,406,407}. Además, en este trabajo se estudió la respuesta celular a nivel de dLN o bazo, pero sería interesante realizar una evaluación más global a nivel de los tejidos, y generar así un “atlas de adyuvantividad” como ha sido recientemente denominado por investigadores de amplia experiencia en el área de los adyuvantes⁴⁰⁶. De esta manera, se podría alcanzar una visión más global de los cambios inducidos por estos adyuvantes, para lograr entender mejor su mecanismo de acción, y poder establecer así los correlatos de adyuvantividad, tan necesarios para poder avanzar en el desarrollo racional de vacunas más seguras y eficaces, que nos permitan hacer frente a futuras pandemias.

6. Bibliografía

1. Rappuoli, R., Mandl, C. W., Black, S. & Gregorio, E. De. Vaccines for the twenty-first century society. *Nature* **11**, 865–872 (2011).
2. Barranco, C. The first live attenuated vaccines. *Nat. Milestones* **284**, S7–S7 (2020).
3. Milstien, J. B., Kaddar, M. & Kieny, M. P. The impact of globalization on vaccine development and availability. *Health Aff.* **25**, 1061–1069 (2006).
4. GAVI. *Global Alliance For Vaccines and Immunisation (GAVI) Fact Sheet, February 2022*. (2022).
5. Perin, J. *et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc. Heal.* **6**, 106–115 (2022).
6. Greenwood, B., Salisbury, D. & Hill, A. V. S. Vaccines and global health. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**, 2733–2742 (2011).
7. Heaton, P. M. Challenges of Developing Novel Vaccines With Particular Global Health Importance. *Front. Immunol.* **11**, 1–13 (2020).
8. Sironi, V. A., Inglese, S. & Lavazza, A. The “One Health” approach in the face of Covid-19: how radical should it be? *Philos. Ethics, Humanit. Med.* **17**, 1–10 (2022).
9. Finco, O. & Rappuoli, R. Designing vaccines for the twenty-first century society. *Front. Immunol.* **5**, 1–7 (2014).
10. Larson, H. J., Gakidou, E. & Murray, C. J. L. The Vaccine-Hesitant Moment. *N. Engl. J. Med.* **387**, 58–65 (2022).
11. Plotkin, S. A. & Plotkin, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 889–893 (2011).
12. Li, X. *et al.* Estimating the health impact of vaccination against ten pathogens in 98 low-income and middle-income countries from 2000 to 2030: a modelling study. *Lancet* **397**, 398–408 (2021).
13. Del Giudice, G., Rappuoli, R. & Didierlaurent, A. M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.* **39**, 14–21 (2018).
14. Plotkin, S. A. & Gilbert, P. B. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1615–1617 (2012).
15. Plotkin, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1055–1065 (2010).
16. Jones, P. G. H. *et al.* Regulatory requirements for vaccine authorisation. *Rev. Sci. Tech.* **26**, 379–93 (2007).
17. Stern, P. L. Key steps in vaccine development. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **125**, 17–27 (2020).
18. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **12**, 509–517 (2011).
19. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).

20. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
21. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 229–265 (2009).
22. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420 (2016).
23. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273 (2009).
24. Heinzl, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L. & Locksley, R. M. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* **169**, 59–72 (1989).
25. Yamamura, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science (80-)*. **254**, 277–279 (1991).
26. Zepp, F. & Zepp, F. Chapter 3 Principles of Vaccination. **1403**, (2016).
27. Finkelman, F. D. *et al.* Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* **201**, 139–155 (2004).
28. Aghbash, P. S. *et al.* The role of Th17 cells in viral infections. *Int. Immunopharmacol.* **91**, 107331 (2021).
29. Wan, Z. *et al.* Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection. *Scand. J. Immunol.* **91**, 1–14 (2020).
30. Maizels, N. & Bothwell, A. The T-cell-independent immune response to the hapten NP uses a large repertoire of heavy chain genes. *Cell* **43**, 715–720 (1985).
31. Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* **176**, 154–170 (2000).
32. Pollard, A. J. & Bijker, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 83–100 (2021).
33. Schijns, V. *et al.* Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination. *Immunol. Rev.* **296**, 169–190 (2020).
34. Reed, S. G., Orr, M. T. & Fox, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* **19**, 1597–1608 (2013).
35. O'Hagan, D. T. & Fox, C. B. New generation adjuvants - From empiricism to rational design. *Vaccine* **33**, B14–B20 (2015).
36. Harandi, A. M., Davies, G. & Olesen, O. F. Vaccine adjuvants: Scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 293–298 (2009).
37. De Gregorio, E., Tritto, E. & Rappuoli, R. Alum adjuvant activity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2068–2071 (2008).
38. Pasquale, A. Di, Preiss, S. & Fleming, A. Vaccine Adjuvants : from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **3**, 320–343 (2015).

39. Ramon, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphtérique. *Bull Soc Centr Med Vet.* **101**, 227–234 (1925).
40. Butler, D. Close but no Nobel: the scientists who never won. *Nature* 1–2 (2016). doi:10.1038/nature.2016.20781
41. Glenny, A., Glenny, M., Pope, C., Waddington, C. & Falacce, U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* **29**, 31–40 (1926).
42. Garçon, N. & Friede, M. Evolution of Adjuvants Across the Centuries. *Plotkin's Vaccines* 61-74.e4 (2018). doi:10.1016/b978-0-323-35761-6.00006-7
43. Freund, J., Casals, J. & Hosmer, E. P. Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Exp. Biol. Med.* **37**, 509–513 (1937).
44. Murray R, Cohen P, H. M. Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies. *Ann Allergy* **3**, 146–151 (1972).
45. Ott, G. *et al.* MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccine. G. Ott *et al.*, *Pharm Biotechnol.* **6**, 277–296 (1995). *Pharm Biotechnol* **6**, 277–296 (1995).
46. O'Hagan, D. T., Ott, G. S., Nest, G. Van, Rappuoli, R. & Giudice, G. Del. The history of MF59 adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 13–30 (2013).
47. Ott, G. *et al.* MF59 Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines. in *Pharm Biotechnol.* **6**, 277–296 (1995).
48. Keefer, M. C. *et al.* Safety and immunogenicity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTP-PE/MF59. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 683–693 (1996).
49. Kahn, J. O. *et al.* Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (hiv) type 1sf2 gp120 subunit vaccine combined with mf59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-hiv-infected human volunteers. *J. Infect. Dis.* **170**, 1288–1291 (1994).
50. Wintsch, J. *et al.* Safety and immunogenicity of a genetically engineered human immunodeficiency virus vaccine. *J. Infect. Dis.* **163**, 219–225 (1991).
51. Podda, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* **19**, 2673–2680 (2001).
52. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1–13 (1989).
53. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science (80-.).* **282**, 2085–2088 (1998).
54. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
55. Tomai, M., Solem, L., Johnson, A. & Ribí, E. The adjuvant properties of a nontoxic monophosphoryl lipid A in hyporesponsive and aging mice. *J Biol Response Mod.* **April; 6**, 99–107 (1987).
56. Levast, B. *et al.* Vaccine Potentiation by Combination Adjuvants. *Vaccines* **2**, 297–322 (2014).

57. Pichichero, M. E. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. *Hum. Vaccin.* **4**, 262–270 (2014).
58. Pulendran, B., S. Arunachalam, P. & O'Hagan, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 454–475 (2021).
59. O'Hagan, D. T., Lodaya, R. N. & Lofano, G. The continued advance of vaccine adjuvants – 'we can work it out'. *Semin. Immunol.* 101426 (2020). doi:10.1016/j.smim.2020.101426
60. Shirodkar, S., Hutchinson, R. L., Perry, D. L., White, J. L. & Hem, S. L. Aluminum Compounds Used as Adjuvants in Vaccines. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* **7**, 1282–1288 (1990).
61. Liu, J. -C, Feldkamp, J. R., White, J. L. & Hem, S. L. Adsorption of phosphate by aluminum hydroxycarbonate. *J. Pharm. Sci.* **73**, 1355–1358 (1984).
62. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–93 (2009).
63. Djuricic, S. *et al.* Aluminium adjuvants used in vaccines. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, (2018).
64. Hutchison, S. *et al.* Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J.* **26**, 1272–1279 (2012).
65. Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122–1126 (2008).
66. Kool, M. *et al.* Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *J. Immunol.* **181**, 3755–3759 (2008).
67. HogenEsch, H. Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants. *Front. Immunol.* **3**, 1–14 (2012).
68. Thakkar, S. G., Xu, H., Li, X. & Cui, Z. Uric acid and the vaccine adjuvant activity of aluminium (oxy)hydroxide nanoparticles. *J. Drug Target.* **26**, 474–480 (2018).
69. Flach, T. L. *et al.* Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.* **17**, 479–487 (2011).
70. Mori, A. *et al.* The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2709–2719 (2012).
71. Morefield, G. L. *et al.* Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* **23**, 1588–1595 (2005).
72. Wu, Z. & Liu, K. Overview of vaccine adjuvants. *Med. Drug Discov.* **11**, 100103 (2021).
73. Mosca, F. *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10501–6 (2008).
74. Morel, S. *et al.* Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* **29**, 2461–2473 (2011).
75. Huber, J. P. & David Farrar, J. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* **132**, 466–474 (2011).

76. Moser, M. & Leo, O. Key concepts in immunology. *Vaccine* **28**, 2–13 (2010).
77. Awate, S., Babiuk, L. A. & Mutwiri, G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.* **4**, 1–10 (2013).
78. Reinke, S., Thakur, A., Gartlan, C., Bezbradica, J. S. & Milicic, A. Inflammasome-Mediated Immunogenicity of Clinical and Experimental Vaccine Adjuvants. *Vaccines* **8**, 554 (2020).
79. Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B. & Bak, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**, 435–457 (2011).
80. Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. & Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**, 275–297 (2007).
81. Hassan, S. M. *et al.* Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chem.* **119**, 600–605 (2010).
82. Simões, C. M. O., Amoros, M. & Girre, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phyther. Res.* **13**, 323–328 (1999).
83. Sparg, S. G., Light, M. E. & van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **94**, 219–243 (2004).
84. Sindambiwe, J. B. *et al.* Evaluation of Biological Activities of Triterpenoid Saponins from *Maesa lanceolata*. *J. Nat. Prod.* **61**, 585–590 (1998).
85. Abdel-Gawad, M. M., El-Sayed, M. M. & Abdel-Hameed, E. S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia* **70**, 371–381 (1999).
86. Mbaveng, A. T. *et al.* A naturally occurring triterpene saponin ardisiacrispin B displayed cytotoxic effects in multi-factorial drug resistant cancer cells via ferroptotic and apoptotic cell death. *Phytomedicine* **43**, 78–85 (2018).
87. Cheng, T.-C. *et al.* Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11319–11329 (2011).
88. Waheed, A. *et al.* A novel steroidal saponin glycoside from *Fagonia indica* induces cell-selective apoptosis or necrosis in cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **47**, 464–473 (2012).
89. Oboh, H. . & Omofoma, C. O. The effects of heat treated Lima Beans (*Phaseolus lunatus*) on plasma lipids in hipercholesterolemia rats. *Pakistan J. Nutr.* **7**, 636–639 (2008).
90. Sheng, H. & Sun, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 543 (2011).
91. Schlotterbeck, T., Castillo-Ruiz, M., Cañon-Jones, H. & San Martín, R. The Use of Leaves from Young Trees of *Quillaja saponaria* (Molina) Plantations as a New Source of Saponins. *Econ. Bot.* **69**, 262–272 (2015).
92. Máthé, Á. & Bandoni, A. *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2*. **7**, (Springer International Publishing, 2021).
93. Molina, J. I. *Saggio sulla storia naturale de Chili*. (Boloña: Stamperia di S. Tomaso d'Aquino. Disponible en Biblioteca Digital - Real Jardín Botánico - CSIC (en italiano)., 1782).

94. Borrell, B. The Tree That Could Help Stop the Pandemic. *The Atlantic* (2020).
95. San Martin, R. Sustainable Production of Quillaja Saponaria Mol. Saponins. in *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants* 271–279 (Springer Netherlands, 2000). doi:10.1007/978-94-015-9339-7_27
96. Dalsgaard, K. Saponin Adjuvants - Isolation of Substance/tom Quillaja saponaria Molina with Adjuvant Activity in Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **254**, 243–254 (1974).
97. Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. & Marciani, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *J Immunol* **146**, 431–436 (1991).
98. Nord, L. I. & Kenne, L. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from Quillaja saponaria Molina. *Carbohydr. Res.* **320**, 70–81 (1999).
99. Nord, L. I. & Kenne, L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from Quillaja saponaria Molina. *Carbohydr. Res.* **329**, 817–829 (2000).
100. Sun, H. X., Xie, Y. & Ye, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27**, 1787–1796 (2009).
101. Kensil, C. R., Wu, J. Y., Anderson, C. A., Wheeler, D. A. & Amsden, J. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Dev. Biol. Stand.* **92**, 41–7 (1998).
102. Kensil, C. R. & Kammer, R. QS-21: A water soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opin. Investig. Drugs* **7**, 1475–1482 (1998).
103. Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O. & Gin, D. Y. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 463–70 (2011).
104. Lee, S. & Nguyen, M. T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Netw.* **15**, 51 (2015).
105. Garçon, N. & Van Mechelen, M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 471–486 (2011).
106. Garçon, N., Chomez, P. & Van Mechelen, M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev. Vaccines* **6**, 723–739 (2007).
107. Singh, M. & O'Hagan, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* **33**, 469–478 (2003).
108. Song, X. & Hu, S. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine* **27**, 4883–4890 (2009).
109. Marciani, D. *et al.* Genetically-engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. *Vaccine* **9**, 89–96 (1991).
110. Laurens, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum. Vaccines Immunother.* **16**, 480–489 (2020).
111. Boutry, C. *et al.* The Adjuvanted Recombinant Zoster Vaccine (RZV) Confers Long-term Protection Against Herpes Zoster: Interim Results of an Extension Study (ZOSTER-049) of Two Clinical Trials (ZOE-50 and ZOE-70). *Clin. Infect. Dis.* **8**, 1459–1467 (2022).
112. Heath, P. T. *et al.* Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*

- 1–12 (2021). doi:10.1056/nejmoa2107659
113. Van Der Meeren, O. *et al.* Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01 E Vaccine to Prevent Tuberculosis . *N. Engl. J. Med.* **379**, 1621–1634 (2018).
 114. Tait, D. R. *et al.* Final Analysis of a Trial of M72/AS01 E Vaccine to Prevent Tuberculosis . *N. Engl. J. Med.* **381**, 2429–2439 (2019).
 115. Wallace, F., Fontana, C., Ferreira, F. & Olivaro, C. Structure Elucidation of Triterpenoid Saponins Found in an Immunoadjuvant Preparation of Quillaja brasiliensis Using. *Molecules* **27**, 1–13 (2022).
 116. San Martin, R. & Briones, R. Industrial Uses and Sustainable Supply of Quillaja saponaria (Roseaceae) saponins. *Econ. Bot.* **53**, 302–311 (1999).
 117. Fernández-Tejada, A. *et al.* Design, synthesis, and immunologic evaluation of vaccine adjuvant conjugates based on QS-21 and tucaresol. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 5917–5923 (2014).
 118. Fernández-Tejada, A., Tan, D. S. & Gin, D. Y. Development of Improved Vaccine Adjuvants Based on the Saponin Natural Product QS-21 through Chemical Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **49**, 1741–1756 (2016).
 119. LOMBARDO, A. *Flora arbórea y arborescente del Uruguay*. (Concejo Departamental de Montevideo, 1964).
 120. Brussa, C. & Grela, I. *Flora arbórea del Uruguay con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. (Talleres gráficos de Mosca, 2007).
 121. Muñoz, J., Ross, P. & Cracco, P. *Flora indígena del Uruguay, árboles y arbustos ornamentales*. (Hemisferio Sur, 2007).
 122. 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.* **20**, 228–233 (2017).
 123. 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.* **30**, 644–652 (2019).
 124. Fleck, J. D. *et al.* Determination of new immunoadjuvant saponin named QB-90, and analysis of its organ-specific distribution in Quillaja brasiliensis by HPLC. *Nat. Prod. Res.* **27**, 907–910 (2013).
 125. Yendo, A. C. A. *et al.* Purification of an Immunoadjuvant Saponin Fraction from Quillaja brasiliensis Leaves by Reversed-Phase Silica Gel Chromatography. in *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols* (ed. Fox, C. B.) **1494**, 87–93 (Springer Science+Business Media, 2017).
 126. Fleck, J. D. *et al.* Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* **24**, 7129–7134 (2006).
 127. Silveira, 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* **29**, 9177–9182 (2011).
 128. De Costa, F. *et al.* Alternative inactivated poliovirus vaccines adjuvanted with Quillaja

- brasiliensis or Quil-A saponins are equally effective in inducing specific immune responses. *PLoS One* **9**, e105374 (2014).
129. Yendo, A. C. A. *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* **34**, 2305–2311 (2016).
 130. Cibulski, S. *et al.* Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine* **36**, 55–65 (2018).
 131. Cibulski, S. *et al.* Zika Virus Envelope Domain III Recombinant Protein Delivered With Saponin-Based Nanoadjuvant From *Quillaja brasiliensis* Enhances Anti-Zika Immune Responses, Including Neutralizing Antibodies and Splenocyte Proliferation. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
 132. Cibulski, S. *et al.* IMXQB-80: A *Quillaja brasiliensis* saponin-based nanoadjuvant enhances Zika virus specific immune responses in mice. *Vaccine* **39**, 571–579 (2021).
 133. Magedans, Y. V. S., Yendo, A. C. A., Costa, F. De, Gosmann, G. & Arthur, G. Foamy matters : an update on *Quillaja* saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Med. Chem.* **11**, 1485–1499 (2019).
 134. de Groot, C. & Muller-Goymann, C. C. Saponin Interactions with Model Membrane Systems - Langmuir Monolayer Studies, Hemolysis and Formation of ISCOMs. *Planta Med.* (2016). doi:10.1055/s-0042-118387
 135. Morein, B., Sundquist, B., Höglund, S., Dalsgaard, K. & Osterhaus, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* **308**, 457–460 (1984).
 136. Morelli, A. B. *et al.* ISCOMATRIX: A novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J. Med. Microbiol.* **61**, 935–943 (2012).
 137. Wilson, N. S. *et al.* ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 540–552 (2012).
 138. Cibulski, S. P. *et al.* Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* **34**, 1162–1171 (2016).
 139. McKenzie, A., Watt, M. & Gittleson, C. ISCOMATRIX vaccines: Safety in human clinical studies. *Hum. Vaccin.* **6**, 237–246 (2010).
 140. Schnurr, M. *et al.* ISCOMATRIX Adjuvant Induces Efficient Cross-Presentation of Tumor Antigen by Dendritic Cells via Rapid Cytosolic Antigen Delivery and Processing via Tripeptidyl Peptidase II. *J. Immunol.* **182**, 1253–9 (2009).
 141. Morelli, A. B. & Maraskovsky, E. ISCOMATRIX Adjuvant in the development of prophylactic and therapeutic vaccines. in *Immunopotenciators in modern vaccines* (eds. Schinjns, V. E. & O'Hagan, D. T.) 311–332 (Academic Press, Elsevier, 2017).
 142. Sanders, M. T., Brown, L. E., Deliyannis, G. & Pearce, M. J. ISCOM TM -based vaccines : The second decade. 119–128 (2005). doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01319.x
 143. Lövgren Bengtsson, K., Morein, B. & Osterhaus, A. D. ISCOM technology-based Matrix MTM adjuvant: success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 401–3 (2011).

144. Sun, H. X., Xie, Y. & Ye, Y. P. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* **27**, 4388–4401 (2009).
145. Pedersen, J. S. *et al.* Structure of immune stimulating complex matrices and immune stimulating complexes in suspension determined by small-angle X-ray scattering. *Biophys. J.* **102**, 2372–2380 (2012).
146. Marciani, D. J. *et al.* Degradation of Quillaja saponaria Molina saponins: loss of the protective effects of a herpes simplex virus 1 subunit vaccine. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1703–1711 (2002).
147. Soltysik, S. *et al.* Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* **13**, 1403–1410 (1995).
148. McSorley, H. J. & Maizels, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 585–608 (2012).
149. Marciani, D. J. Is fucose the answer to the immunomodulatory paradox of Quillaja saponins? *Int. Immunopharmacol.* **29**, 908–913 (2015).
150. Detienne, S. *et al.* Central Role of CD169(+) Lymph Node Resident Macrophages in the Adjuvanticity of the QS-21 Component of AS01. *Sci. Rep.* **6**, 39475 (2016).
151. Wilson, N. S. *et al.* Inflammasome-Dependent and -Independent IL-18 Production Mediates Immunity to the ISCOMATRIX Adjuvant. *J. Immunol.* **192**, 3259–68 (2014).
152. Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P.-Y. & Re, F. Cutting Edge: Inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J. Immunol.* 17–21 (2008). doi:10.1038/jid.2014.371
153. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
154. Sangiuliano, B., Pérez, N. M., Moreira, D. F. & Belizário, J. E. Cell Death-Associated Molecular-Pattern Molecules: Inflammatory Signaling and Control. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–14 (2014).
155. Yang, H. *et al.* MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J. Exp. Med.* **212**, 5–14 (2015).
156. Welsby, I. *et al.* Lysosome-dependent activation of human dendritic cells by the vaccine adjuvant QS-21. *Front. Immunol.* **7**, 1–17 (2017).
157. Den Brok, M. H. *et al.* Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat. Commun.* **7**, 13324 (2016).
158. Huis in 't Veld, L. G. M., Ho, N. I., Wassink, M., den Brok, M. H. & Adema, G. J. Saponin-based adjuvant-induced dendritic cell cross-presentation is dependent on PERK activation. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 231 (2022).
159. Marciani, D. J. Elucidating the Mechanisms of Action of Saponin-Derived Adjuvants. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 573–585 (2018).
160. Turley, J. L. & Lavelle, E. C. Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy. *Curr. Opin. Immunol.* **77**, 102229 (2022).
161. Burdock, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **36**, (1998).
162. Bankova, V., Popova, M. & Trusheva, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity

- and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.* **8**, 28 (2014).
163. Kujumgiev, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 235–240 (1999).
 164. El Ashry, E. S. H. & Ahmad, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine* **1–9** (2012). doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.095
 165. Búfalo, M. C., Bordon-Graciani, A. P., Conti, B. J., de Assis Golim, M. & Sforcin, J. M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* **66**, 1497–1504 (2014).
 166. Orsatti, C. L. & Sforcin, J. M. Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. *Nat. Prod. Res.* **26**, 446–453 (2012).
 167. Ma, X. *et al.* Phytochemical Constituents of Propolis Flavonoid, Immunological Enhancement, and Anti-porcine Parvovirus Activities Isolated From Propolis. *Front. Vet. Sci.* **9**, 1–11 (2022).
 168. Fan, Y. *et al.* The Adjuvant Activity of Epimedium Polysaccharide-Propolis Flavone Liposome on Enhancing Immune Responses to Inactivated Porcine Circovirus Vaccine in Mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, (2015).
 169. Fischer, G. *et al.* Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **116**, 79–84 (2007).
 170. Fischer, G. *et al.* Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* **25**, 1250–1256 (2007).
 171. Ma, X. *et al.* The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig. *Cell. Immunol.* **270**, 13–18 (2011).
 172. Sforcin, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res* **30**, 894–905 (2016).
 173. Tao, Y. *et al.* The immunological enhancement activity of propolis flavonoids liposome in vitro and in vivo. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2014**, (2014).
 174. Bachiega, T. F., Orsatti, C. L., Pagliarone, A. C. & Sforcin, J. M. The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. *Phyther. Res.* **26**, 1308–1313 (2012).
 175. Búfalo, M. C. & Sforcin, J. M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. *J. Pharm. Pharmacol.* **67**, 740–745 (2015).
 176. Woods, N. *et al.* Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. in *Immunopotentiators in Modern Vaccines* 211–229 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-804019-5.00011-6
 177. Jasprica, I. *et al.* In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 548–554 (2007).
 178. Mani, F., Damasceno, H. C. R., Novelli, E. L. B., Martins, E. A. M. & Sforcin, J. M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 95–98 (2006).
 179. Lendemans, D. G., Myschik, J., Hook, S. & Rades, T. Immuno-stimulating complexes

- prepared by ethanol injection. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 729–733 (2005).
180. Yuan, J. *et al.* The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 400–405 (2012).
 181. Silva, V. *et al.* Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6430–6437 (2011).
 182. Kumazawa, S. *et al.* Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4777–4782 (2002).
 183. Serra Bonvehi, J. & Ventura Coll, F. Study on propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **55**, 778–784 (2000).
 184. Zunini, M. P. *et al.* PHENOLIC CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN CENTRAL-SOUTHERN URUGUAYAN PROPOLIS EXTRACTS. **1**, 141–146 (2010).
 185. Park, Y. K., Alencar, S. M. & Aguiar, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2502–2506 (2002).
 186. Nyindo, M. & Lukumbagire, A.-H. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–8 (2015).
 187. Mas-Coma, S., Valero, M. A. & Bargues, M. D. Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. in *Advances in Parasitology* **69**, 41–146 (2009).
 188. Caravedo, M. A. & Cabada, M. Human Fascioliasis: Current Epidemiological Status and Strategies for Diagnosis, Treatment, and Control. *Res. Rep. Trop. Med.* **Volume 11**, 149–158 (2020).
 189. Fürst, T., Keiser, J. & Utzinger, J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 210–221 (2012).
 190. Boray, J. C. Trematode Infections of Domestic Animals. in *Chemotherapy of Parasitic Diseases* 401–425 (Springer US, 1986). doi:10.1007/978-1-4684-1233-8_20
 191. Mehmood, K. *et al.* A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb. Pathog.* **109**, 253–262 (2017).
 192. da Costa, R. A., Corbellini, L. G., Castro-Janer, E. & Riet-Correa, F. Evaluation of losses in carcasses of cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*: effects on weight by age range and on carcass quality parameters. *Int. J. Parasitol.* **49**, 867–872 (2019).
 193. de Waal, T. Diseases of Dairy Animals: Parasites, Internal: Liver Flukes. in *Encyclopedia of Dairy Sciences* **1**, 451–458 (Elsevier, 2016).
 194. Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P. & Vercruysse, J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* **30**, 361–367 (2014).
 195. Lalor, R. *et al.* Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola Gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis. *Virulence* **12**, 2839–2867 (2021).
 196. Galaktionov, K. V. & Dobrovolskij, A. A. *The biology and evolution of trematodes: An essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes.* *The American Journal of Semiotics* **4**, (2003).
 197. Bargues, M. . *et al.* European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts

- of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.* **1**, 85–107 (2001).
198. Cwiklinski, K. *et al.* Infection by the Helminth Parasite *Fasciola hepatica* Requires Rapid Regulation of Metabolic, Virulence, and Invasive Factors to Adjust to Its Mammalian Host. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 792–809 (2018).
 199. Kaya, M., Beştaş, R. & Sedat, Ç. Clinical presentation and management of *Fasciola hepatica* infection: Single-center experience. *World J. Gastroenterol.* **17**, 4899–4904 (2011).
 200. Cwiklinski, K. *et al.* The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* **16**, 71 (2015).
 201. de la Torre-Escudero, E. *et al.* Surface molecules of extracellular vesicles secreted by the helminth pathogen *Fasciola hepatica* direct their internalisation by host cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007087 (2019).
 202. Fromm, B. *et al.* The revised microRNA complement of *Fasciola hepatica* reveals a plethora of overlooked microRNAs and evidence for enrichment of immuno-regulatory microRNAs in extracellular vesicles. *Int. J. Parasitol.* **45**, 697–702 (2015).
 203. Mas-Coma, S., Bargues, M. D. & Valero, M. A. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitology* **145**, 1665–1699 (2018).
 204. Roberts, J. A. & Suhardono. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. *Int. J. Parasitol.* **26**, 971–981 (1996).
 205. Rinaldi, L. *et al.* A one-health integrated approach to control fascioliasis in the Cajamarca valley of Peru. *Geospat. Health* **6**, 67–73 (2012).
 206. Statham, J. M. E. Control of liver fluke: An emerging issue in terms of veterinary residues. *Vet. Rec.* **177**, 519–521 (2015).
 207. Aguilera-Luiz, M. M., Martínez Vidal, J. L., Romero-González, R. & Garrido Frenich, A. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **132**, 2171–2180 (2012).
 208. Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F. & Cabrera, R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet. Parasitol.* **178**, 364–366 (2011).
 209. Fairweather, I., Brennan, G. P., Hanna, R. E. B., Robinson, M. W. & Skuce, P. J. Drug resistance in liver flukes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **12**, 39–59 (2020).
 210. Molina-Hernández, V. *et al.* *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* **208**, 101–111 (2015).
 211. Smooker, P. M., Kennedy, N. J., Steeper, K. R., Christopoulos, H. & Spithill, T. W. *Fasciola*: Kinetics and quality of humoral responses to fatty acid binding protein and cathepsin L following delivery as DNA vaccines in mice. *Exp. Parasitol.* **97**, 154–160 (2001).
 212. Espino, A. M., Osuna, A., Gil, R. & Hillyer, G. V. *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA

- vaccine in mice. *Exp. Parasitol.* **110**, 374–383 (2005).
213. Jayaraj, R., Piedrafita, D., Spithill, T. & Smooker, P. Evaluation of the immune responses induced by four targeted DNA vaccines encoding the juvenile liver fluke antigen, cathepsin B in a mouse model. *Genet. Vaccines Ther.* **10**, 7 (2012).
 214. Acosta, D., Goñi, F. & Carmona, C. Characterization and Partial Purification of a Leucine Aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *Am. Soc. Parasitol.* **84**, 1–7 (1998).
 215. Maggioli, G. *et al.* The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* **29**, 9057–9063 (2011).
 216. Matsui, M., Fowler, J. H. & Walling, L. L. Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **387**, 1535–1544 (2006).
 217. Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J. P. & Carmona, C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* **67**, 1954–1961 (1999).
 218. Acosta, D. *et al.* *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 52–64 (2008).
 219. Rivera, F. & Espino, A. M. Adjuvant-Enhanced Antibody and Cellular Responses to Inclusion Bodies Expressing FhSAP2 Correlates with Protection of Mice to *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* **160**, 31–38 (2016).
 220. Vercruysse, J. *et al.* Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology* **145**, 1655–1664 (2018).
 221. Mulcahy, G. *et al.* Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.* **67**, 27–33 (1999).
 222. Mulcahy, G. *et al.* Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **16**, 932–939 (1998).
 223. Walsh, K. P., Brady, M. T., Finlay, C. M., Boon, L. & Mills, K. H. G. Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF- β -Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses. *J. Immunol.* **183**, 1577–1586 (2009).
 224. Donnelly, S., O'Neill, S. M., Sekiya, M., Mulcahy, G. & Dalton, J. P. Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infect. Immun.* **73**, 166–173 (2005).
 225. Donnelly, S. *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J.* **22**, 4022–4032 (2008).
 226. O'Neill, S. M. *et al.* *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* **22**, 147–155 (2000).
 227. Brady, M. T., O'Neill, S. M., Dalton, J. P. & Mills, K. H. G. *Fasciola hepatica* Suppresses a Protective Th1 Response against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **67**, 5372–5378 (1999).
 228. Flynn, R. J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O. & Mulcahy, G. Experimental *Fasciola hepatica* Infection Alters Responses to Tests Used for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun.* **75**, 1373–1381 (2007).

229. Flynn, R. J. *et al.* Co-Infection of Cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis* - Immunological Consequences. *Transbound. Emerg. Dis.* **56**, 269–274 (2009).
230. Vukman, K. V., Adams, P. N., Metz, M., Maurer, M. & O'Neill, S. M. *Fasciola hepatica* Tegumental Coat Impairs Mast Cells' Ability To Drive Th1 Immune Responses. *J. Immunol.* **190**, 2873–2879 (2013).
231. Colley, D. G. & Secor, W. E. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **36**, 347–357 (2014).
232. Wright, P. F. & Webster, R. G. Orthomyxoviridae. in *Field's Virology* (eds. Fields, B. N. *et al.*) **2**, 1253–1292 (Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001).
233. Tregoning, J. S., Russell, R. F. & Kinnear, E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **14**, 550–564 (2018).
234. Lambert, L. C. & Fauci, A. S. Influenza Vaccines for the Future. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2036–2044 (2010).
235. Matsuzaki, Y. *et al.* Clinical Features of Influenza C Virus Infection in Children. *J. Infect. Dis.* **193**, 1229–1235 (2006).
236. World Health Organisation. Global Influenza Strategy Summary 2019-2030 Influenza. *Glob. Infl. Strateg. 2019-2030 Infl.* **1**, 2 (2019).
237. Paget, J. *et al.* Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J. Glob. Health* **9**, 1–12 (2019).
238. Sellers, S. A., Hagan, R. S., Hayden, F. G. & Fischer, W. A. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respi. Viruses* **11**, 372–393 (2017).
239. Kwong, J. C. *et al.* Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection. *N. Engl. J. Med.* **378**, 345–353 (2018).
240. Paules, C. & Subbarao, K. Influenza. *Lancet* **390**, 697–708 (2017).
241. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 1–21 (2018).
242. Russell, C. A. *et al.* The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science (80-.)*. **320**, 340–346 (2008).
243. Houser, K. & Subbarao, K. Influenza vaccines: Challenges and solutions. *Cell Host Microbe* **17**, 295–300 (2015).
244. Paules, C. I. & Fauci, A. S. Influenza Vaccines: Good, But We Can Do Better. *J. Infect. Dis.* **219**, (2019).
245. Wei, C. J. *et al.* Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 239–252 (2020).
246. Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J. P. & Kersten, G. F. A. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94**, 251–263 (2015).
247. Doherty, P. C., Turner, S. J., Webby, R. G. & Thomas, P. G. Influenza and the challenge for immunology. *Nat. Immunol.* **7**, 449–455 (2006).

248. Sridhar, S., Brokstad, K. A. & Cox, R. J. Influenza vaccination strategies: Comparing inactivated and live attenuated influenza vaccines. *Vaccines* **3**, 373–389 (2015).
249. Hobson, D., Curry, R. L., Beare, A. S. & Ward-Gardner, A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg. (Lond)*. **70**, 767–777 (1972).
250. Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, B. A virus obtained from Influenza patiens. *Lancet* 66–68 (1933).
251. Wrammert, J. *et al.* Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* **453**, 667–671 (2008).
252. Manicassamy, B. *et al.* Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
253. Steens, A. *et al.* Age-dependent patterns of infection and severity explaining the low impact of 2009 influenza A (H1N1): Evidence from serial serologic surveys in the Netherlands. *Am. J. Epidemiol.* **174**, 1307–1315 (2011).
254. Yu, X. *et al.* Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* **455**, 532–536 (2008).
255. Heaton, N. S., Sachs, D., Chen, C. J., Hai, R. & Palese, P. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20248–20253 (2013).
256. Doud, M. B. & Bloom, J. D. Accurate measurement of the effects of all amino-acid mutations on influenza hemagglutinin. *Viruses* **8**, 1–17 (2016).
257. Seibert, C. W. *et al.* Recombinant IgA Is Sufficient To Prevent Influenza Virus Transmission in Guinea Pigs. *J. Virol.* **87**, 7793–7804 (2013).
258. Lowen, A. C. *et al.* Blocking Interhost Transmission of Influenza Virus by Vaccination in the Guinea Pig Model. *J. Virol.* **83**, 2803–2818 (2009).
259. Del Giudice, G. & Rappuoli, R. Inactivated and Adjuvanted Influenza Vaccines. in *Current Topics in Microbiology and Immunology DOI:* (Springer International Publishing 2014, 2014). doi:10.1007/82_2014_406
260. Petrovsky, N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Saf.* **38**, 1059–1074 (2015).
261. Yue, Y., Xu, W. & Xiong, S. Modulation of immunogenicity and immunoprotection of mucosal vaccine against coxsackievirus B3 by optimizing the coadministration mode of lymphotactin adjuvant. *DNA Cell Biol.* **31**, 479–88 (2012).
262. Manzoli, L. *et al.* Meta-analysis of the immunogenicity and tolerability of pandemic influenza A 2009 (H1N1) vaccines. *PLoS One* **6**, 1–12 (2011).
263. Paillot, R. *et al.* ISCOM-based equine influenza vaccine: Duration of immunity and randomised clinical trials to assess an accelerated schedule of immunisation and efficacy. *Trials Vaccinol.* **4**, 61–70 (2015).
264. Liu, Y. V. *et al.* Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A(H7N9) virus infection in ferrets. *Vaccine* **33**, 2152–2158 (2015).
265. Mastrogiovanni, M. Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de

- Quillaja brasiliensis. (2012).
266. Yendo, A. *et al.* Purification of an Immunoadjuvant Saponin Fraction from Quillaja brasiliensis Leaves by Reversed-Phase Silica Gel Chromatography. in *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols* (ed. Fox, C. B.) **1494**, 87–93 (Springer New York, 2017).
 267. Rivera-Patron, M., Cibulski, S. P., Miraballes, I. & Silveira, F. Formulation of IMXQB: Nanoparticles Based on Quillaja brasiliensis Saponins to be Used as Vaccine Adjuvants. in *Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **2469** (ed. Fett-Neto, A. G.) 183–191 (Springer Nature, 2022). doi:10.1007/978-1-0716-2185-1_15
 268. Mowat, A. M. & Reid, G. Preparation of Immune Stimulating Complexes (ISCOMs) as Adjuvants. in *Current Protocols in Immunology* **16**, 1–12 (1995).
 269. Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S. O. & Kwon, H. W. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement. Altern. Med.* 1–12 (2016). doi:10.1186/s12906-016-1043-y
 270. Woisky, R. G. & Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **37**, 99–105 (1998).
 271. Bankova, V. *et al.* Standard methods for Apis mellifera propolis research. *J. Apic. Res.* **8839**, 1–49 (2016).
 272. Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M. & Azad, A. F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr. Protoc. Microbiol.* **11**, 1–7 (2008).
 273. Rayasam, A. Isolating and culturing dendritic cells (Dendritic Cell J558 Protocol). *Protoc. Exch.* 22–24 (2015). doi:10.1038/protex.2015.024
 274. Yang, M., Hearnden, C. H. A., Oleszycka, E. & Lavelle, E. C. NLRP3 inflammasome activation and cytotoxicity induced by particulate adjuvants. in *The inflammasome, Methods and Protocols* (ed. Christine M. De Nardo and Eicke Latz) **1040**, 41–63 (Springer Science+Business Media, 2013).
 275. Silveira, F. *et al.* Alum - type Adjuvant Effect of Non - haemolytic Saponins Purified from Ilex and Passiflora spp. *Phyther. Res.* **1788**, 1783–1788 (2011).
 276. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 277. Grisham, M. B., Johnson, G. G. & Lancaster, J. R. J. Quantitation of Nitrate and Nitrite in Extracellular Fluids. *Methods Enzym.* **268**, 237–246 (1996).
 278. Bryan, N. S. & Grisham, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 645–657 (2007).
 279. Reed, L. J. & Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 493–497 (1938).
 280. Czerkinsky, C., Nilsson, L. Å., Nygren, H., Ouchterlony, Ö. & Tarkowski, A. Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of IgG rheumatoid factor-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **65**, 109–121 (1984).
 281. Lv, J. *et al.* Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice. *BMC Infect Dis* **14**, 197 (2014).

282. Boulet, S. *et al.* A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN- γ HIV-specific immune responses. *J. Immunol. Methods* **320**, 18–29 (2007).
283. Rivera-Patron, M. *et al.* ISCOM-Like Nanoparticles Formulated with Quillaja brasiliensis Saponins Are Promising Adjuvants for Seasonal Influenza Vaccines. *Vaccines* **9**, 1–18 (2021).
284. Kite, G. C., Howes, M. J. R. & Simmonds, M. S. J. Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of Quillaja saponaria by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2859–2870 (2004).
285. Guo, S., Lennart, K., Lundgren, L. N., Rönnerberg, B. & Sundquist, B. G. Triterpenoid saponins from Quillaja saponaria. *Phytochemistry* **48**, 175–180 (1998).
286. Kauffmann, C. *et al.* Constituents from leaves of Quillaja brasiliensis. *Nat. Prod. Res.* **18**, 153–157 (2004).
287. Cibulski, S. *et al.* ISCOM-Matrices Nanoformulation Using the Raw Aqueous Extract of Quillaja lancifolia (Q. brasiliensis). *Bionanoscience* (2022). doi:10.1007/s12668-022-01023-8
288. Zhu, D. & Tuo, W. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat. Prod. Chem. Res.* **03**, 3–4 (2015).
289. European Medicines Agency (EMA). Shingrix (herpes zoster vaccine, recombinant, adjuvanted). (2020). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/shingrix-epar-medicine-overview_en.pdf. (Accessed: 28th April 2022)
290. Shinde, V. *et al.* Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1899–1909 (2021).
291. Wang, P. Natural and synthetic saponins as vaccine adjuvants. *Vaccines* **9**, 1–18 (2021).
292. Fernández-Tejada, A. *et al.* Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21. *Nat. Chem.* **6**, 635–43 (2014).
293. Pifferi, C., Fuentes, R. & Fernández-Tejada, A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 197–216 (2021).
294. Azharuddin, M. *et al.* Nano toolbox in immune modulation and nanovaccines. *Trends Biotechnol.* **xx**, 1–18 (2022).
295. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
296. Zhang, Y. N. *et al.* Nanoparticle Size Influences Antigen Retention and Presentation in Lymph Node Follicles for Humoral Immunity. *Nano Lett.* **19**, 7226–7235 (2019).
297. Shah, R. R. *et al.* The droplet size of emulsion adjuvants has significant impact on their potency, due to differences in immune cell-recruitment and -activation. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
298. Fifis, T., Mottram, P., Bogdanoska, V., Hanley, J. & Plebanski, M. Short peptide sequences containing MHC class I and/or class II epitopes linked to nano-beads induce strong immunity and inhibition of growth of antigen-specific tumour challenge in mice.

- Vaccine* **23**, 258–266 (2004).
299. Fifis, T. *et al.* Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J. Immunol.* **173**, 3148–3154 (2004).
 300. Duewell, P. *et al.* ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *J. Immunol.* **187**, 55–63 (2011).
 301. Morelli, A. B. & Maraskovsky, E. *ISCOMATRIX Adjuvant in the Development of Prophylactic and Therapeutic Vaccines. Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition* (Elsevier Ltd, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-804019-5.00016-5
 302. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
 303. Pearse, M. J. & Drane, D. ISCOMATRIX R adjuvant for antigen delivery. **57**, 465–474 (2005).
 304. Sun, H., Xie, Y. & Ye, Y. ISCOMs and ISCOMATRIX. **27**, 4388–4401 (2009).
 305. Cibulski, S. P. *et al.* Quillaja brasiliensis saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
 306. Lorent, J. H., Quetin-Leclercq, J. & Mingeot-Leclercq, M.-P. 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.* **12**, 8803–8822 (2014).
 307. Russell, W. M. & Burch, R. . Principle of Human Experimental Techniques. 1–229 (1959).
 308. Bigaeva, E., Doorn, E. van, Liu, H. & Hak, E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS One* **11**, e0154757 (2016).
 309. Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849–863 (2006).
 310. Nutt, S. L. & Chopin, M. Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function. *Immunity* **52**, 942–956 (2020).
 311. Pulendran, B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and toll-like receptors. *Immunol. Rev.* **199**, 227–250 (2004).
 312. Kasturi, S. P. *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* **470**, 543–550 (2011).
 313. Kasturi, S. P. *et al.* Adjuvanting a Simian Immunodeficiency Virus Vaccine with Toll-Like Receptor Ligands Encapsulated in Nanoparticles. *J. Virol.* 1–25 (2017).
 314. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptative immunity by the innate immune system. *Science (80-.)*. **327**, 291–295 (2010).
 315. Detienne, S. *et al.* Suppl Central Role of CD169+ Lymph Node Resident Macrophages in the Adjuvanticity of the QS- 21 Saponin - Supplementary Material. *Sci. Rep.* **6**, 1–7 (2016).
 316. Grandón, A. S. *et al.* Variation of Saponin Contents and Physiological Status in Quillaja saponaria Under Different Environmental Conditions. *Nat. Prod. Commun.* **8**,

- 1934578X1300801 (2013).
317. Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. & Noelle, R. J. CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 307–328 (2004).
 318. Ma, D. Y. & Clark, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* **21**, 265–272 (2009).
 319. Yang, J. & Yan, H. TLR5: Beyond the recognition of flagellin. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 1017–1019 (2017).
 320. Tegtmeyer, N. *et al.* Toll-like Receptor 5 Activation by the CagY Repeat Domains of *Helicobacter pylori*. *Cell Rep.* **32**, (2020).
 321. Sharp, F. A. *et al.* Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 870–875 (2009).
 322. Marty-Roix, R. *et al.* Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *J. Biol. Chem.* **291**, 1123–1136 (2016).
 323. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Immunology: Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science (80-.).* **310**, 1510–1512 (2005).
 324. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145–173 (1989).
 325. Walsh, K. P., Brady, M. T., Finlay, C. M., Boon, L. & Mills, K. H. G. Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF- β -Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses. *J. Immunol.* **183**, 1577–1586 (2009).
 326. Burlingham, W. J., Jankowska-Gan, E., VanBuskirk, A. M., Pelletier, R. P. & Orosz, C. G. Delayed Type Hypersensitivity Responses. in *Measuring Immunity* (eds. Latze, M. T. & Thomson, A. W.) 407–418 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/B978-012455900-4/50297-X
 327. Cibulski, S. P. *et al.* Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 1–8 (2016).
 328. Fitzgerald, D. C. *et al.* Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1372–1379 (2007).
 329. Stumhofer, J. S. *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* **8**, 1363–1371 (2007).
 330. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777 (2008).
 331. Maizels, R. M., Smits, H. H. & McSorley, H. J. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity* **49**, 801–818 (2018).
 332. Trelis, M. *et al.* Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* **46**, 799–808 (2016).
 333. Martínez-Fernández, A. R. *et al.* Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet.*

- Parasitol.* **126**, 287–298 (2004).
334. López-Abán, J. *et al.* Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet. Parasitol.* **145**, 287–296 (2007).
 335. Taghipour, A. *et al.* Highlights of human ectopic fascioliasis: a systematic review. *Infect. Dis. (Auckl)*. **51**, 785–792 (2019).
 336. Liu, Y., Hardie, J., Zhang, X. & Rotello, V. M. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. *Semin. Immunol.* **34**, 25–32 (2017).
 337. Jazayeri, S. D., Lim, H. X., Shameli, K., Yeap, S. K. & Poh, C. L. Nano and Microparticles as Potential Oral Vaccine Carriers and Adjuvants Against Infectious Diseases. *Front. Pharmacol.* **12**, 1–15 (2021).
 338. Silva, A. L., Soema, P. C., Slütter, B., Ossendorp, F. & Jiskoot, W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 1056–1069 (2016).
 339. Cao, S. jun *et al.* Nanoparticles: Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs. *AAPS PharmSciTech* **20**, 1–11 (2019).
 340. Mohamedi, S. A., Heath, A. W. & Jennings, R. A comparison of oral and parenteral routes for therapeutic vaccination with HSV-2 ISCOMs in mice; cytokine profiles, antibody responses and protection. *Antiviral Res.* **49**, 83–99 (2001).
 341. Mowat, A. M. I. *et al.* CTA1-DD-Immune Stimulating Complexes: a Novel, Rationally Designed Combined Mucosal Vaccine Adjuvant Effective with Nanogram Doses of Antigen. *J. Immunol.* **167**, 3398–3405 (2001).
 342. Ghazi, H. O., Potter, C. W., Smith, T. L. & Jennings, R. Comparative antibody responses and protection in mice immunised by oral or parenteral routes with influenza virus subunit antigens in aqueous form or incorporated into ISCOMs. *J. Med. Microbiol.* **42**, 53–61 (1995).
 343. Zhang, L., Ding, Z. & Heyman, B. IgG3-antigen complexes are deposited on follicular dendritic cells in the presence of C1q and C3. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
 344. Cooper, L. J. N., Robertson, D., Granzow, R. & Greenspan, N. S. Variable domain-identical antibodies exhibit IgG subclass-related differences in affinity and kinetic constants as determined by surface plasmon resonance. *Mol. Immunol.* **31**, 577–584 (1994).
 345. Hovenden, M. *et al.* IgG Subclass and Heavy Chain Domains Contribute to Binding and Protection by mAbs to the Poly γ -D-glutamic Acid Capsular Antigen of *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog.* **9**, 1–12 (2013).
 346. Michaelsen, T. E., Kolberg, J., Aase, A., Herstad, T. K. & Høiby, E. A. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand. J. Immunol.* **59**, 34–39 (2004).
 347. Klaus, T. & Bereta, J. CH2 Domain of Mouse IgG3 Governs Antibody Oligomerization, Increases Functional Affinity to Multivalent Antigens and Enhances Hemagglutination. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).
 348. Guthmiller, J. J. *et al.* An egg-derived sulfated n-acetyllactosamine glycan is an antigenic

- decoy of influenza virus vaccines. *MBio* **12**, 1–13 (2021).
349. An, Y. *et al.* N -Glycosylation of Seasonal Influenza Vaccine Hemagglutinins: Implication for Potency Testing and Immune Processing. *J. Virol.* **93**, 1–22 (2019).
 350. Kim, P. *et al.* Glycosylation of hemagglutinin and neuraminidase of influenza a virus as signature for ecological spillover and adaptation among influenza reservoirs. *Viruses* **10**, 1–18 (2018).
 351. Medina, R. A. *et al.* Glycosylations in the Globular Head of the Hemagglutinin Protein Modulate the Virulence and Antigenic Properties of the H1N1 Influenza Viruses. *Sci. Transl. Med.* **5**, 1558–1570 (2013).
 352. Kosik, I. & Yewdell, J. W. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin–Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses* **11**, 346 (2019).
 353. Kosik, I. *et al.* Influenza A virus hemagglutinin glycosylation compensates for antibody escape fitness costs. *PLOS Pathog.* **14**, e1006796 (2018).
 354. Collins, A. M. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 949–954 (2016).
 355. Schmidt-Nielsen, K. *Scaling. Why is animal size so important?* (Cambridge University Press, 1984).
 356. Perlmutter, R. M., Hansburg, D., Briles, D. E., Nicolotti, R. A. & David, J. M. Subclass Restriction of Murine Anti-Carbohydrate Antibodies. *J. Immunol.* **121**, 566–572 (1978).
 357. Tobita, T., Oda, M. & Azuma, T. Segmental flexibility and avidity of IgM in the interaction of polyvalent antigens. *Mol. Immunol.* **40**, 803–811 (2004).
 358. Roux, K. H., Strelets, L. & Michaelsen, T. E. Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol.* **159**, 3372–3382 (1997).
 359. Burgess, A. W. & Metcalf, D. The nature and action of granulocyte - macrophage colony stimulating factors. *Blood* **56**, 947–958 (1980).
 360. Hamilton, J. A., Stanley, E. R., Burgess, A. W. & Shadduck, R. K. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J. Cell. Physiol.* **103**, 435–445 (1980).
 361. Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation. *J. Exp. Med.* **217**, 1–16 (2019).
 362. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 533–544 (2008).
 363. Becher, B., Tugues, S. & Greter, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* **45**, 963–973 (2016).
 364. Gonzalez-Juarrero, M. *et al.* Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 914–922 (2005).
 365. Carbonneil, C. *et al.* Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- α are potent inducers of HIV-specific CD8 T cells. *Aids* **17**, 1731–1740 (2003).
 366. Parajuli, B. *et al.* GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J. Neuroinflammation*

- 9, 1–12 (2012).
367. Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *J. Immunol.* **178**, 5245–5252 (2007).
 368. Trus, E., Basta, S. & Gee, K. Who's in charge here? Macrophage colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor: Competing factors in macrophage polarization. *Cytokine* **127**, 154939 (2020).
 369. Unkel, B. *et al.* Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. *J. Clin. Invest.* **122**, 3652–3664 (2012).
 370. Lau, Y.-F., Tang, L.-H., Ooi, E.-E. & Subbarao, K. Activation of the innate immune system provides broad-spectrum protection against influenza A viruses with pandemic potential in mice. *Virology* **406**, 80–87 (2010).
 371. Kim, H. M. *et al.* Alveolar Macrophages Are Indispensable for Controlling Influenza Viruses in Lungs of Pigs. *J. Virol.* **82**, 4265–4274 (2008).
 372. Petrina, M., Martin, J. & Basta, S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor has come of age : From a vaccine adjuvant to antiviral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **59**, 101–110 (2021).
 373. Seo, S. H. & Webster, R. G. Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *J. Virol.* **76**, 1071–1076 (2002).
 374. Stewart, D. *et al.* Genetic contribution to the septic response in a mouse model. *Shock* **18**, 342–347 (2002).
 375. Hsieh, B. C., Macatonia, S. E., Garra, A. O. & Murphy, K. M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development In vitro. *J. Exp. Med.* **181**, 713–721 (1995).
 376. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166–6173 (2000).
 377. Fornefett, J. *et al.* Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella pneumotropica*) strain. *BMC Microbiol.* **18**, 1–11 (2018).
 378. Huber, V. C. *et al.* Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 981–990 (2006).
 379. Tomar, J. *et al.* Advax augments B and T cell responses upon influenza vaccination via the respiratory tract and enables complete protection of mice against lethal influenza virus challenge. *J. Control. Release* **288**, 199–211 (2018).
 380. Reber, A. & Katz, J. Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 519–536 (2013).
 381. Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**, S45 (2005).
 382. De Magistris, M. T. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in

- pediatrics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 52–67 (2006).
383. Mitragotri, S. Immunization without needles. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 905–916 (2005).
 384. De Temmerman, M. L. *et al.* Particulate vaccines: On the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* **16**, 569–582 (2011).
 385. Kunda, N. K., Somavarapu, S., Gordon, S. B., Hutcheon, G. A. & Saleem, I. Y. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharm. Res.* **30**, 325–341 (2013).
 386. Sjölander, S. *et al.* Intranasal immunisation with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Vaccine* **19**, 4072–4080 (2001).
 387. Huber, V. C., Lynch, J. M., Bucher, D. J., Le, J. & Metzger, D. W. Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Makes a Significant Contribution to Clearance of Influenza Virus Infections. *J. Immunol.* **166**, 7381–7388 (2001).
 388. DiLillo, D. J., Palese, P., Wilson, P. C. & Ravetch, J. V. Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. *J. Clin. Invest.* **126**, 605–610 (2016).
 389. He, W. *et al.* Broadly Neutralizing Anti-Influenza Virus Antibodies: Enhancement of Neutralizing Potency in Polyclonal Mixtures and IgA Backbones. *J. Virol.* **89**, 3610–3618 (2015).
 390. Leon, P. E. *et al.* Optimal activation of Fc-mediated effector functions by influenza virus hemagglutinin antibodies requires two points of contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5944–E5951 (2016).
 391. Freyn, A. W. *et al.* Influenza hemagglutinin-specific IgA Fc-effector functionality is restricted to stalk epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, 1–11 (2021).
 392. Gunn, B. M. & Bai, S. Building a better antibody through the Fc: advances and challenges in harnessing antibody Fc effector functions for antiviral protection. *Hum. Vaccines Immunother.* **17**, 4328–4344 (2021).
 393. Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 626–638 (2016).
 394. Flanagan, K. L., Fink, A. L., Plebanski, M. & Klein, S. L. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **33**, 577–599 (2017).
 395. Fink, A. L., Engle, K., Ursin, R. L., Tang, W.-Y. & Klein, S. L. Biological sex affects vaccine efficacy and protection against influenza in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 12477–12482 (2018).
 396. Petrović, R. *et al.* Mouse strain and sex as determinants of immune response to trivalent influenza vaccine. *Life Sci.* **207**, 117–126 (2018).
 397. Knudsen, N. P. H. *et al.* Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci. Rep.* **6**, 19570 (2016).
 398. Andreu, N. *et al.* Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).

-
399. Rathinam, V. A. K., Zhao, Y. & Shao, F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* **20**, 527–533 (2019).
400. Schijns, V. E. J. C. Vaccine Adjuvants' Mode of Action: Unraveling 'the Immunologist's Dirty Little Secret'. *Immunopotentiators Mod. Vaccines Second Ed.* 1–22 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-804019-5.00001-3
401. Shi, S. *et al.* Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* **37**, 3167–3178 (2019).
402. Domínguez-Andrés, J., van Crevel, R., Divangahi, M. & Netea, M. G. Designing the next generation of vaccines: Relevance for future pandemics. *MBio* **11**, 1–16 (2020).
403. Muñoz-Wolf, N. & Lavelle, E. C. Promotion of trained innate immunity by nanoparticles. *Semin. Immunol.* **56**, 101542 (2021).
404. Lavelle, E. C. & Ward, R. W. Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. *Nat. Rev. Immunol.* (2021). doi:10.1038/s41577-021-00583-2
405. Cebon, J. S. *et al.* Results of a randomized, double-blind phase II clinical trial of NY-ESO-1 vaccine with ISCOMATRIX adjuvant versus ISCOMATRIX alone in participants with high-risk resected melanoma. *J. Immunother. Cancer* **8**, 1–11 (2020).
406. Lee, A. *et al.* A molecular atlas of innate immunity to adjuvanted and live attenuated vaccines, in mice. *Nat. Commun.* **13**, 1–13 (2022).
407. Harandi, A. M. Systems analysis of human vaccine adjuvants. *Semin. Immunol.* **39**, 30–34 (2018).

7. Anexos

7.1. Artículos publicados a partir de esta Tesis

- 7.1.1. Rivera-Patron M, Moreno M, Baz M, Roehe PM, Cibulski SP, Silveira F. “ISCOM-Like Nanoparticles Formulated with *Quillaja brasiliensis* Saponins Are Promising Adjuvants for Seasonal Influenza Vaccines”. *Vaccines* 2021;9:1–18.
- 7.1.2. Cibulski SP, Rivera-Patron M, Mourglia-Ettlin G, Casaravilla C, Yendo ACA, Fett-Neto AG, Chabalgoity JA, Moreno M, Roehe PM, Silveira F. “*Quillaja brasiliensis* saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses”. *Scientific Reports* 2018;8:1–15.
- 7.1.3. Cibulski S, Rivera-Patron M, Suárez N, Pirez M, Rossi S, Yendo ACA, de Costa F, Gosmann G, Fett-Neto AG, Roehe PM, Silveira F. “Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines”. *Vaccine* 2018;36:55–65.

7.2. Capítulo de libro publicado a partir de esta Tesis

- 7.2.1. Rivera-Patron M, Cibulski SP, Miraballes I and Silveira, F. “Formulation of IMXQB: Nanoparticles Based on *Quillaja brasiliensis* Saponins to be Used as Vaccine Adjuvants”. In: Fett-Neto AG (ed.). *Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 2469. Second Edition. *Springer Nature*, 2022, 183–91.

Article

ISCOM-Like Nanoparticles Formulated with *Quillaja brasiliensis* Saponins Are Promising Adjuvants for Seasonal Influenza Vaccines

Mariana Rivera-Patron ¹, María Moreno ¹, Mariana Baz ², Paulo M. Roehe ³, Samuel P. Cibulski ^{3,4,*}
and Fernando Silveira ^{1,*}

- ¹ Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo 11600, Uruguay; mrivera@higiene.edu.uy (M.R.-P.); mmoreno@higiene.edu.uy (M.M.)
- ² Research Center in Infectious Diseases of the CHU of Québec and Université Laval, Québec City, QC G1V 4G2, Canada; Mariana.Baz@crchudequebec.ulaval.ca
- ³ Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia, UFRGS, Porto Alegre 90050-170, Brazil; proehe@gmail.com
- ⁴ Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia—CBiotec, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, Brazil
- * Correspondence: spcibulski@gmail.com (S.P.C.); fsilveira@higiene.edu.uy (F.S.)



Citation: Rivera-Patron, M.; Moreno, M.; Baz, M.; Roehe, P.M.; Cibulski, S.P.; Silveira, F. ISCOM-Like Nanoparticles Formulated with *Quillaja brasiliensis* Saponins Are Promising Adjuvants for Seasonal Influenza Vaccines. *Vaccines* **2021**, *9*, 1350. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111350>

Academic Editors: Alessio Facciola and Giuseppa Visalli

Received: 22 October 2021

Accepted: 14 November 2021

Published: 18 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Vaccination is the most effective public health intervention to prevent influenza infections, which are responsible for an important burden of respiratory illnesses and deaths each year. Currently, licensed influenza vaccines are mostly split inactivated, although in order to achieve higher efficacy rates, some influenza vaccines contain adjuvants. Although split-inactivated vaccines induce mostly humoral responses, tailoring mucosal and cellular immune responses is crucial for preventing influenza infections. *Quillaja brasiliensis* saponin-based adjuvants, including ISCOM-like nanoparticles formulated with the QB-90 saponin fraction (IQB90), have been studied in preclinical models for more than a decade and have been demonstrated to induce strong humoral and cellular immune responses towards several viral antigens. Herein, we demonstrate that a split-inactivated IQB90 adjuvanted influenza vaccine triggered a protective immune response, stronger than that induced by a commercial unadjuvanted vaccine, when applied either by the subcutaneous or the intranasal route. Moreover, we reveal that this novel adjuvant confers up to a ten-fold dose-sparing effect, which could be crucial for pandemic preparedness. Last but not least, we assessed the role of caspase-1/11 in the generation of the immune response triggered by the IQB90 adjuvanted influenza vaccine in a mouse model and found that the cellular-mediated immune response triggered by the IQB90-Flu relies, at least in part, on a mechanism involving the casp-1/11 pathway but not the humoral response elicited by this formulation.

Keywords: adjuvants; *Quillaja brasiliensis*; ISCOMs; influenza virus; dose-sparing effect

1. Introduction

Influenza type A and B virus cause respiratory infections in many species, including humans, and the World Health Organization (WHO) estimates that they cause 3–5 million severe cases and 290,000 to 650,000 deaths worldwide yearly [1]. Vaccination is the best cost-effective strategy for preventing infectious diseases including influenza. Currently, licensed influenza vaccines contain either subunit, inactivated, or live attenuated influenza viruses. The most widely used vaccines are subunits containing partially purified surface antigens such as hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) or split-inactivated vaccines [2]. However, due to the antigenic drifts, shifts, and reassortments that are frequent events with influenza viruses, vaccines must be updated seasonally. Antibodies are crucial for achieving protection from influenza infections and target mostly HA and NA influenza surface

antigens [3]. Antibodies targeting the HA head domain are typically neutralizing, as they block the entrance of the virus to the host cell. The main entry pathway for influenza virus are the mucosal surfaces of the respiratory tract; thus, secretory IgA (sIgA) antibodies play a key role in the prevention of the infection, inhibiting viral transmission [4]. In order to elicit adequate immune responses and to achieve higher efficacy rates in specific populations, such as the elderly, some influenza vaccines contain adjuvants [5]. Adjuvants can not only potentiate the immune response of a given vaccine but also provide a dose-sparing effect, polarize, or even accelerate the immune response prompted by the vaccine [6]. Several adjuvants have been licensed in influenza vaccines formulations such as aluminum salts, MF59[®], AS03, and AF03 [5]. *Quillaja saponaria* bark-extracted triterpenoid saponins have been widely used as vaccine adjuvants for veterinary vaccines for many decades [7,8]. Recently, a malaria and a herpes zoster vaccine containing the purified saponin QS-21 have been licensed for human use. These are the RTS,S vaccine (MosquirixTM), the first EMA approved vaccine against malaria for endemic population, and Shingrix[®], a herpes zoster vaccine for the elderly [9]. In addition, among the different vaccine candidates that are being developed in order to tackle the COVID-19 pandemic, Novavax[®] has developed a nanoparticle saponin-based adjuvanted vaccine, named NVX-CoV2373, for which a Th1 biased immune response was detected during phase I and II [10], and it has shown an efficacy of 86.3% against the B.1.1.7 (alpha) variant and 96.4% against non-B.1.1.7 variants during phase III [11].

Immune-stimulating complexes (ISCOMs) are cage-like nanoparticles of approximately 40 nm, obtained combining *Q. saponaria* saponins, lipids, and protein antigens [12]. Our group has been studying the adjuvant capacity of saponins obtained from the leaves of *Q. brasiliensis* [13–19], a native tree from South America [20]. Previous reports have shown remarkable similarities between QB-90 fraction and QuilA saponins, both in their chemical structure and from an immunological properties perspective when used with herpesvirus [21] and poliovirus [14] antigens in mouse models. In addition, we have previously reported that QB-90 is less toxic than QuilA both in vivo and in vitro, suggesting that QB-90 could be used as an alternative to QuilA [16,22]. Furthermore, using the model antigen ovalbumin (OVA), we reported for the first time that soluble saponins, either QuilA or QB-90, are able to trigger both humoral and cellular immune response in a similar manner. Likewise, the ISCOM nanoparticles formulated with them, either QB-90 (IQB90) or QuilA (IQuilA), induce comparable immune responses both at humoral and cellular levels [22]. In particular, we demonstrated that IQB90 improves antigen uptake, induces a potent cellular-mediated immune response (CMI) and induces a strong humoral immune response, both at mucosal and systemic levels, in a mice model [22]. Recently, we reported that matrices of IQB90 (ISCOMs without antigen) are able to trigger early local and systemic cellular responses [23]. In addition, we reported that this formulation is able to activate inflammasome complexes through caspase-1/11 and MyD88 pathways in vitro. Moreover, the IQB90 formulation was proven to induce a strong mixed Th1/Th2 adaptive immune response [23]. Herein, we demonstrate that a split-inactivated IQB90-adjuvanted influenza vaccine triggers a stronger immune response than a commercial unadjuvanted vaccine, when applied either by the subcutaneous (s/c) or the intranasal (i.n.) route, and that the triggered response is adequate to confer protection against an influenza infection. In addition, we reveal that this novel adjuvant not only enhances the potency of the immune response but also confers up to a ten-fold dose-sparing effect. Finally, we assessed the role of caspase-1/11 in the generation of the adaptive immunity in response to vaccination with an IQB90 adjuvanted-influenza vaccine in mice.

2. Materials and Methods

2.1. Vaccine Adjuvants

Leaves from adult plants of *Q. brasiliensis* (A. St.-Hil. et Tul) Mart. were collected in Canguçu, RS, Brazil (31°23'42" S–52°40'32" W) (voucher ICN 142953, deposited at the

Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul). Extraction and purification of QB-90 saponin fractions were carried out as previously described [24].

2.2. Antigen Preparation

Antigen was obtained from trivalent split-inactivated influenza virus vaccine (Instituto Butantan, *Myxovirus influenzae* 2016 strains A/California/7/2009 (H1N1) pdm09, A/Hong Kong/4891/2014 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Victoria lineage) south hemisphere, batch N3B82, Ministério da Saúde, Governo Federal, Brazil) containing 15 µg of hemagglutinin (HA) per strain in 0.5 mL. Briefly, 24.5 mL of the antigen suspension were concentrated using Amicon[®] Ultra-15 30K (Millipore, Ref: UFC 903008). Antigen concentration was calculated considering the initial concentration of hemagglutinin (90 µg/mL), the initial (24.5 mL) and the final volume (1.593 mL) obtained with a retention rate of 10%, according to manufacturer's instructions. The desired final concentration (1 mg/mL of HA per influenza strain) was attained by adding an appropriate volume of saline solution.

2.3. Experimental Vaccine Preparations

2.3.1. Unadjuvanted Influenza Vaccine

The 1 mg/mL antigen solution obtained previously was diluted in saline solution in order to obtain a final concentration of 25 µg/mL of HA per influenza strain (total HA content 75 µg/mL).

2.3.2. IQB90 Adjuvanted Influenza Vaccine

ISCOMs with viral antigen (IQB90-Flu) were prepared by the modified ethanol injection technique [22,25]. Briefly, the concentrated viral antigen solution (1 mg/mL in PBS, pH 7.4) was added to a solution of *Q. brasiliensis* saponins (QB-90, 1 mg/mL). Ethanol-dissolved cholesterol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and di-palmitoyl phosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, USA) were immediately injected into the mixture, which was gently stirred for 48 h at 4 °C. After that procedure, ISCOMs derived from QB-90 fraction containing the influenza viral antigen (IQB90-Flu) were obtained. The final concentration of QB-90 saponins used in the formulation of the IQB90-Flu was 50 µg/mL. Three formulations of IQB90-Flu were prepared with different concentrations of total HA antigen (75, 7.5, or 0.75 µg/mL). All three formulations contained 50 µg/mL of QB-90 within the ISCOMs. Nanoparticle assembly was confirmed visually by transmission electron microscopy (TEM). In order to determine the toxicity of the IQB90-Flu with the three preparations, hemolysis assays were performed as previously described [22].

2.4. Transmission Electron Microscopy (TEM)

An aliquot (10 µL) of an aqueous solution of IQB90-Flu was placed on a copper grid covered with formvar and carbon film (200 mesh) and negatively stained with 2% phosphotungstic acid (pH 7.2) for 2 min at room temperature. Once dried, the samples were examined with a JEM 1010 transmission electron microscope (JEOL, Japan), operated at an 80 kV accelerating voltage and at magnifications between 30,000 and 150,000×.

2.5. Mouse Immunizations and Sample Collection

Animal manipulation was performed in accordance with Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) guidelines and was approved by the Ethics Committee of Universidad de la República (CHEA, Udelar, CHEA approval protocol n° 468).

Casp-1/11 knockout (ko) and littermate (wt) female C57Bl/6 mice (8–12 weeks old) were purchased from the Institut Pasteur Montevideo (Uruguay), and female BALB/c mice (8–12 weeks old) were purchased from DILAVE (MGAP-Uruguay). All animals were kept at the Instituto de Higiene (Montevideo, Udelar) animal breeding facility, housed in ventilated racks under controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity (50–60%) in a 12/12 h light/dark cycle, with food and water ad libitum. Prior to the beginning of the

experiments, animals were acclimatized over one week under the controlled conditions previously indicated.

Female BALB/c mice were immunized on days 0 and 14 with previously described formulations containing viral antigen through subcutaneous (s/c) or intranasal (i.n.) routes. S/c immunizations ($n = 9$) were performed with 100 μ L in the hind neck with 75, 7.5, or 0.75 μ g/mL of total HA (antigen) contained in IQB90-Flu or 75 μ g/mL of antigen alone (Flu). For intranasal immunization, mice ($n = 10$) were anesthetized with ketamine–xylazine and received 100 μ L of 75 μ g/mL of antigen per dose in vaccinated groups, either IQB90-Flu or alone (unadjuvanted). Bleedings were performed immediately prior to inoculations (days 0 and 14) and 2 weeks after the second immunization (day 28). Sera were stored at -20°C until use.

C57Bl/6 casp-1/11 ko and wt female mice ($n = 5$) were immunized on days 0 and 14 through the s/c route in the hind neck with 100 μ L of previously described formulations containing 75 μ g/mL of total HA (antigen) either in IQB90-Flu, without adjuvant (Flu), or with saline solution (without antigen nor any adjuvant) as control. Bleedings were performed immediately prior to inoculations (days 0 and 14) and 2 weeks after the second immunization (day 28). Sera were stored at -20°C until use.

2.6. Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) Assay

Delayed-type hypersensitivity (DTH) responses were evaluated as described previously [13]. Briefly, casp-1/11 wt and ko C57Bl/6 mice previously inoculated twice with adjuvanted formulation (IQB90-Flu, $n = 5$), antigen alone (Flu, $n = 5$), or with physiological solution only ($n = 3$) received one intradermal (ID) injection of 10 μ L containing 0.075 μ g of total HA in right hind footpad. The thickness of the injected (right) and non-injected (left) footpads were measured 24 and 48 h later with a caliper. The swelling of mice from the control group (previously inoculated only with physiological solution) was considered as basal swelling. The vaccine-induced influenza-specific DTH response of each animal was calculated based on the thickness of its injected footpad minus the thickness of its non-injected (left) footpad.

2.7. Antibody-Level Determination Assays

The antibodies against the influenza virus (i.e., IgG total, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3, and IgGA) were assayed by indirect ELISA as described previously [22]. Briefly, 96-well ELISA plates (Greiner Bio-One, Darmstadt, Germany) were coated overnight at 4°C with the vaccine influenza antigen described above (1.0 μ g/mL) diluted in PBS (pH 7.2). Plates were then washed three times with PBS containing 0.05% Tween[®] 20 (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (PBST) and blocked with 1% Tween[®] 20 in PBS at 37°C for 2 h. Appropriately diluted mouse serum samples were added in duplicate (100 μ L/well) and incubated for 1 h at 37°C . After washing three times with PBST, HRP-conjugated anti-mouse with either total IgG (cat. n° 1030-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA), IgG1 (cat. n° 1071-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA), IgG2b (cat. n° 1091-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA), IgG2a (cat. n° 1081-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA), IgG3 (cat. n° 1101-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA), or IgG2c (cat. n° 1079-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA) diluted 1/10,000 in PBST were added to each well, and plates were incubated for 1 h at 37°C . After three washings, 100 μ L of ortho-phenylenediamine (OPD; Sigma, Saint Louis, MO, USA) with 0.003% H_2O_2 were added, and plates were incubated for 30 min at 25°C . Reactions were stopped with 30 μ L/well of 1N HCl. Optical densities (ODs) were measured in an ELISA plate reader (Sunrise, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at 490 nm. A standard curve was built using a pool of positive sera, and antibody levels were expressed in arbitrary units per mL (AU/mL).

The hemagglutination inhibition (HAI) titer was determined by measuring the serum inhibition of agglutination by vaccine-derived HA and turkey red blood cells (RBCs). Serum samples were treated with RDE enzyme (receptor-destroying enzyme from *Vibrio cholerae*,

Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and then were tested for HAI activity against the trivalent fragmented and inactivated influenza virus vaccine (Instituto Butantan, Ministério da Saúde, Governo Federal, Sao Paulo, Brazil) using turkey red blood cells. The HAI titer was expressed as the dilution of sample that inhibited influenza virus agglutination of RBC.

2.8. ELISpot Assay for Influenza-Specific IgG Antibody Secreting Cells

On day 30 post-priming, mice were euthanized by cervical dislocation, the spleen removed, and splenocytes were obtained aseptically. The frequency of influenza virus-specific IgG antibody-secreting cells (ASCs) was determined using the ELISpot assay as described previously [26]. Briefly, 96-well ELISpot plates (Millipore, Darmstadt, Germany) were wetted with a 15 µL/well of 35% ethanol and left to almost dry for several minutes as indicated by the manufacturer. Plates were then washed with filtered phosphate saline buffer (PBS) and coated for 2 h at 37 °C with 7.5 µg/mL of HA influenza antigen. After washing with filtered PBS, plates were blocked with 200 µL of 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma, Saint Louis, MO, USA) overnight (ON) at 4 °C. Plates were washed again and 2×10^5 splenocytes (in 100 µL of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum) from vaccinated mice 30 days post-priming were added and incubated overnight at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. After incubation, cells were removed by washing, and horseradish peroxidase (HRP)/goat anti-mouse total IgG conjugate (cat. n° 1030-05 Southern Biotech Birmingham, AL, USA) was added and incubated for 2 h at 37 °C. Plates were washed and stained with aminoethylcarbazol (AEC) solution in acetate buffer and 0.1% hydrogen peroxide for 30 min protected from light at room temperature. The reaction was stopped by thorough rinsing with tap water, and plates were dried at room temperature for 3 days. Spots were counted and the result obtained is expressed as the number of anti-influenza IgG ASC per 2×10^5 cells.

2.9. Mouse Challenge

Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC CCL-34) were cultured in EMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum (SFB) and the antibiotics penicillin and streptomycin (Gibco) at 37 °C/5% CO₂. When cells reached ~80% confluence, 2009 H1N1 pandemic influenza virus (A/Brazil/G3P1/2013 (H1N1; GenBank accession number: KP027598-KP027605) was inoculated in the presence of N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin (5 µg/mL). After an adsorption period of 1 h at 37 °C, 15 mL of EMEM with 1 µg/mL TPCK was added to the flasks and the cytopathic effect (CPE) was monitored. When CPE reached ~80%, the supernatants were recovered and titrated in plaque-forming units (PFUs) per mL using standard procedures.

Four weeks (28 days) after immunization of female BALB/c mice, mice ($n = 6$) were anesthetized with ketamine–xylazine and intranasally challenged with a sublethal dose of 10^3 PFU of (H1N1) pdm2009 in 50 µL. Animals were visually inspected throughout the study challenge and weighed on a daily basis for fourteen days.

2.10. Statistical Analyses

Statistical significance was assessed by Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s post-test to compare among different groups of mice. When only two groups were compared, a non-parametric *t*-test and Mann–Whitney post-test were used. In the case of loss of weight, a two-way ANOVA (with matched values stacked into a sub-column) analysis was performed, and Fisher’s LSD post-test to compare among different groups of mice (considering unadjuvanted inoculated group as the control group, unless indicated differently). Statistically significant differences were considered when $p \leq 0.05$. In all cases, GraphPad Prism version 8.4.2 (679) software (GraphPad Software, LCC) was used.

3. Results and Discussion

3.1. QB-90 ISCOMs Formulated with Influenza Antigen (IQB90-Flu) Are Non-Toxic Cage-Like Structures

The QB-90 ISCOMs co-formulated with influenza antigen (IQB90-Flu) were visualized by transmission electron microscopy (TEM), showing the expected cage-like structures of approximately 40 nm (Figure 1).

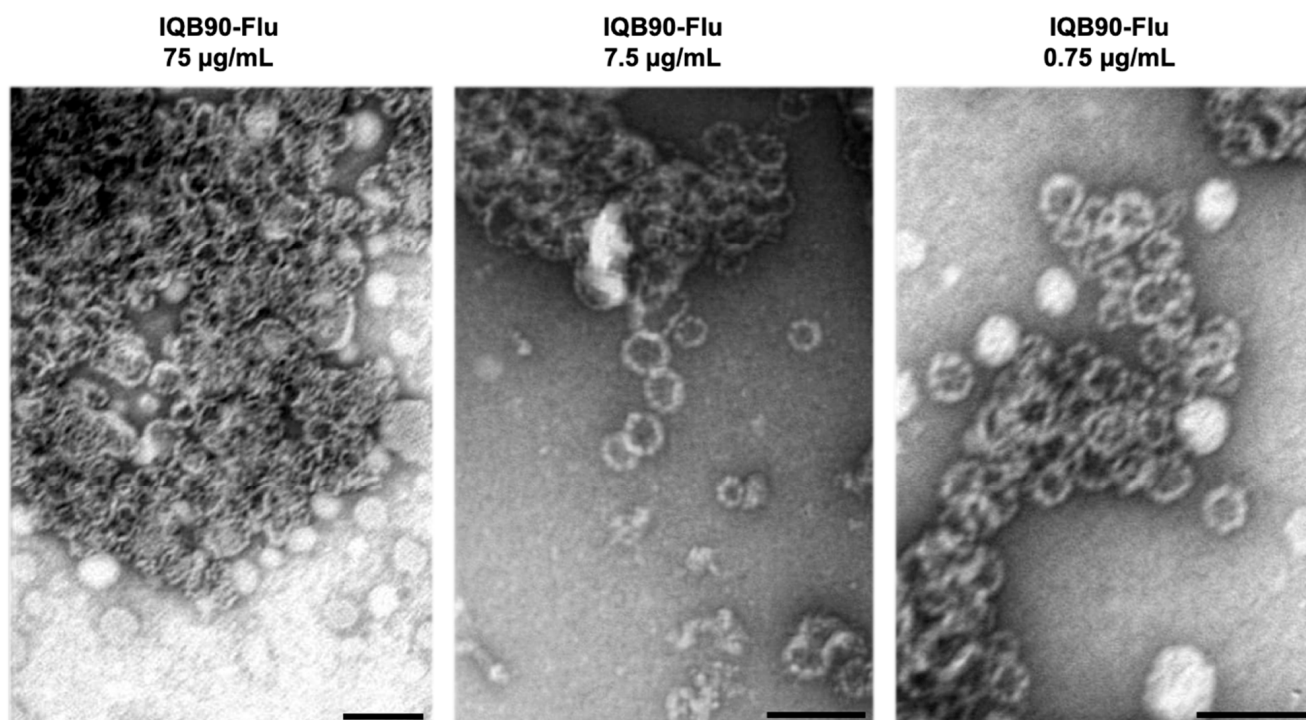


Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) of ISCOMs of QB-90 saponins and influenza antigen (IQB90-Flu). ISCOMs were produced by the ethanol injection method with QB-90 saponins and influenza antigen as previously described. Preparations were stained with 2% phosphotungstic acid and observed by TEM. Scale bars represent 100 nm. IQB90-Flu appeared as cage-like nanoparticles of approximately 40 nm.

The hemolysis of red blood cells is a major indicator of the toxicity of saponins and must be evaluated when the development of saponin-based adjuvants is the objective. As previously reported, ISCOM nanoparticles impair the hemolytic capacity of saponins [22]. All IQB90-Flu formulations have been shown not to cause membrane damage according to the results of a hemolysis assay (data not shown). Moreover, IQB90 have been previously proven to be safe and well tolerated in mice in terms of toxicity [22,23]; here, again, the experimentally vaccinated animals in this study did not show any signs of distress (i.e., lethality, local swelling, loss of hair, and piloerection) after the administration of two doses of the adjuvanted split-inactivated seasonal influenza vaccine. In addition, commercial preparations of ISCOM-based adjuvants (derived from *Q. saponaria* saponins) have been demonstrated to be safe and well tolerated in mice, other animals [27], and humans [28–30].

3.2. Intranasal or Subcutaneous Administration of IQB90-Flu Vaccine Induced Higher Antibody Levels Than the Commercial Influenza Vaccine in Mice

In order to determine the humoral immune response elicited by the formulation, BALB/c mice were inoculated as shown in Figure 2A. The IQB90-Flu delivered intranasally was able to elicit higher levels of IgM antibody levels 14 days post-priming (Figure 2B) and higher IgA antibody levels 28 days post-priming (Figure 2C), higher than Flu. In addition, the IQB90-Flu vaccine induced higher total IgG antibody levels than Flu throughout the study (Figure 2D), in particular, 28 days post-priming (Figure 2E). Regarding the isotypes

of the antibodies elicited at day 28 post-priming, the IBQB90-Flu vaccine was able to elicit higher IgG1 (Figure 2F), IgG2a (Figure 2G), IgG2b (Figure 2H), and IgG3 (Figure 2I) antibody levels than the unadjuvanted vaccine.

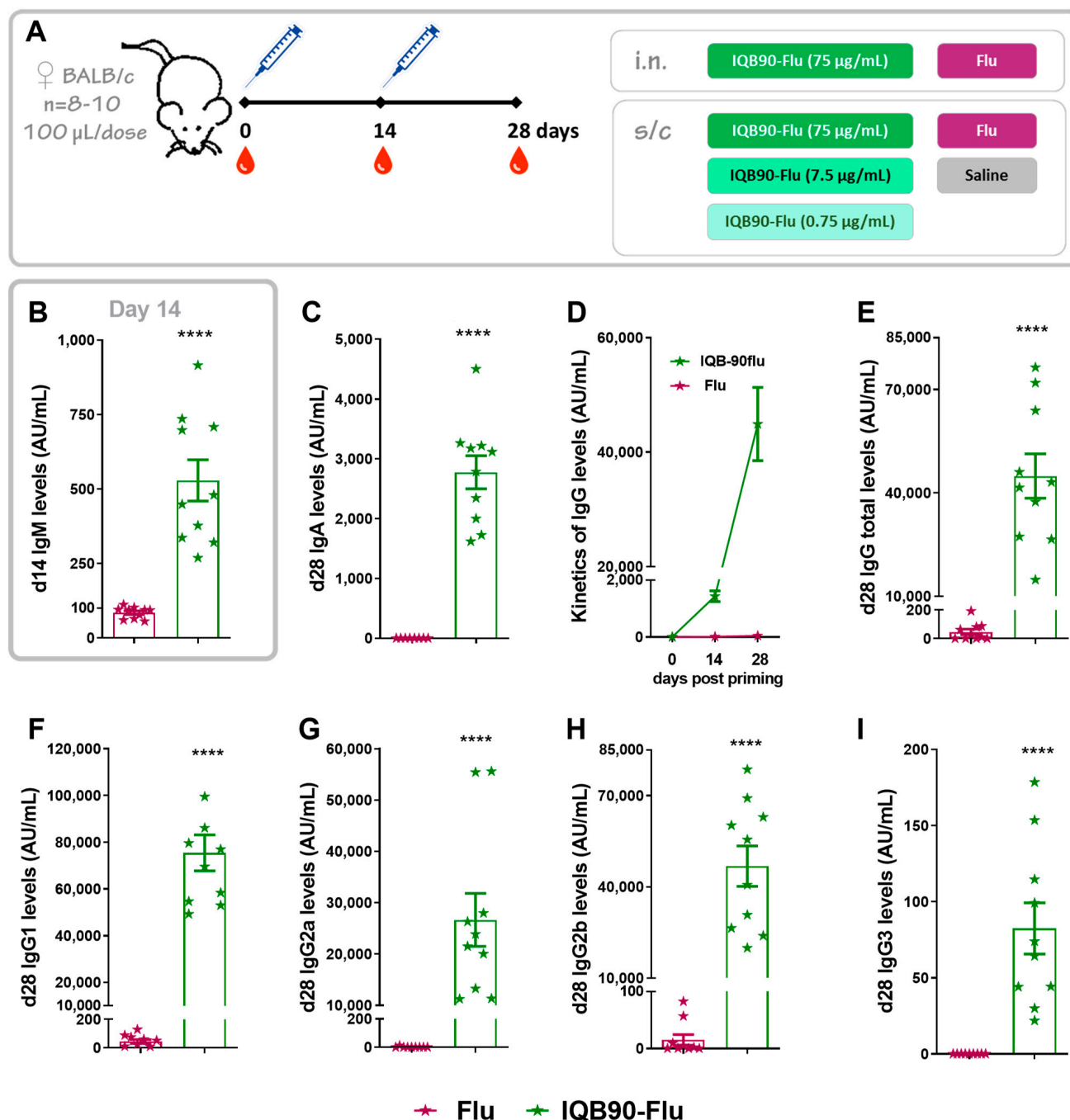


Figure 2. Intranasal administration of IQB90-Flu adjuvanted influenza vaccine elicited higher antibody levels in sera than the commercial vaccine. Schematic vaccination schedule (A). Immunizations were performed intranasally at day 0 (priming) and 14 (booster) either with an IQB90 adjuvanted formulation (“IQB90-Flu”, green stars) or with no adjuvant (“Flu”, commercial vaccine, pink stars), and antibody levels were measured in sera. Specific anti-influenza IgM levels 14 days post-priming are shown in (B), and IgA antibody levels 28 days post-priming are shown in (C). Total IgG kinetics are shown in (D), and total IgG (E), IgG1 (F), IgG2a (G), IgG2c (H), and IgG3 (I) antibody levels against influenza antigen were measured in sera 28 days post booster. **** Indicates $p < 0.0001$, Mann–Whitney’s test.

When mice were vaccinated following the same schedule via the subcutaneous (s/c) route, IQB90-Flu (75 µg/mL) vaccinated mice elicited a higher total IgM antibody-

ies level than mice inoculated with the non-adjuvanted vaccine (Figure 3A). At day 28 post-priming, total IgA (Figure 3B), IgG (Figure 3C), IgG1 (Figure 3D), IgG2a (Figure 3E), IgG2b (Figure 3F), and IgG3 (Figure 3G) levels were higher in groups inoculated with the adjuvanted vaccines than in mice inoculated with the commercial Flu vaccine. The kinetics of total IgG at days 0, 14, and 28 is shown in Figure 3H.

The induction of mucosal immunity would contribute to generating specific secretory IgA antibodies that would be expected to prevent the infection of a respiratory pathogen and promote herd immunity [31], while the IgG systemic response would be expected to lead to more effective protection [32]. In addition, the i.n. route is easily accessible and the mucosal tissues are highly vascularized; thus, an immune response can be triggered at distant mucosal sites (due to the dissemination of effector immune cells in the common mucosal immune system), and last but not least, as the mucosal immunization does not require the use of needles, it prevents potential sources of infection with other agents [33]. On the other hand, to prompt an efficient immune response in the mucosal airway is a challenging task due to the tolerogenic mechanisms that underlie the mucosal tissues. The antigen uptake and presentation in the mucosal airway tends to be more complex than in other tissues. For these reasons, the adjuvants to be used in mucosal immunizations must be able to trigger an efficient immune response. It has been reported that to achieve such an aim, adjuvants must promote antigen uptake by mucosal dendritic cells (DCs), key players in triggering adaptive immune responses in the lung, which lead to appropriate antigen presentation and activation of T and B cells. Nonetheless, it has been shown that particulate substances are more properly internalized by the mucosal-associated lymphoid tissue DCs [34]. The shape, size, and nature of the ISCOMs are crucial in order to improve the internalization of the antigen by DCs and avoid phagocytic cells, such as alveolar macrophages [35], as has been reported for *Q. saponaria*-derived ISCOMs in influenza vaccines [36]. In addition, the adjuvant must be safe, well tolerated and, importantly, it must not affect the central nervous system. Unfortunately, previously, a live-attenuated influenza vaccine adjuvanted with *E. coli* heat-labile toxin (LT) had to be withdrawn due to the latter issue [5]. Instead, ISCOMs have been proven to be well tolerated and safe [30]. Taking into account these considerations and the immune response triggered by IQB90-Flu (Figure 2), *Q. brasiliensis*-derived ISCOMs show potential as adjuvants to intranasal influenza vaccines.

3.3. IQB90-Flu Conferred a Ten-Fold Dose-Sparing Effect in a Split-Inactivated Influenza Vaccine

As the amount of antigen required per vaccine dose could be an important issue in the preparedness for a new influenza pandemic, which might result in a larger number of doses available to the population, we assessed whether the IQB90-Flu adjuvanted vaccine was able to induce a dose-sparing effect. In previous studies, we have demonstrated that an aqueous extract of *Q. brasiliensis* leaves (AE), when used as a vaccine adjuvant, was able to induce a dose-sparing effect in formulations containing even one-fifth of the original antigen in bovine viral diarrhea virus (BVDV) experimental vaccines [18]. Therefore, in order to assess whether this would be valid for influenza vaccines, two additional groups were inoculated subcutaneously with the adjuvanted experimental vaccine containing 50 µg/mL of QB-90 saponins, and either one-tenth ("IQB90-Flu 1/10" containing 7.5 µg/mL of total HA) or one-cent ("IQB90 1/100" containing 0.75 µg/mL of total HA) of the antigen contained in the "Flu" formulation.

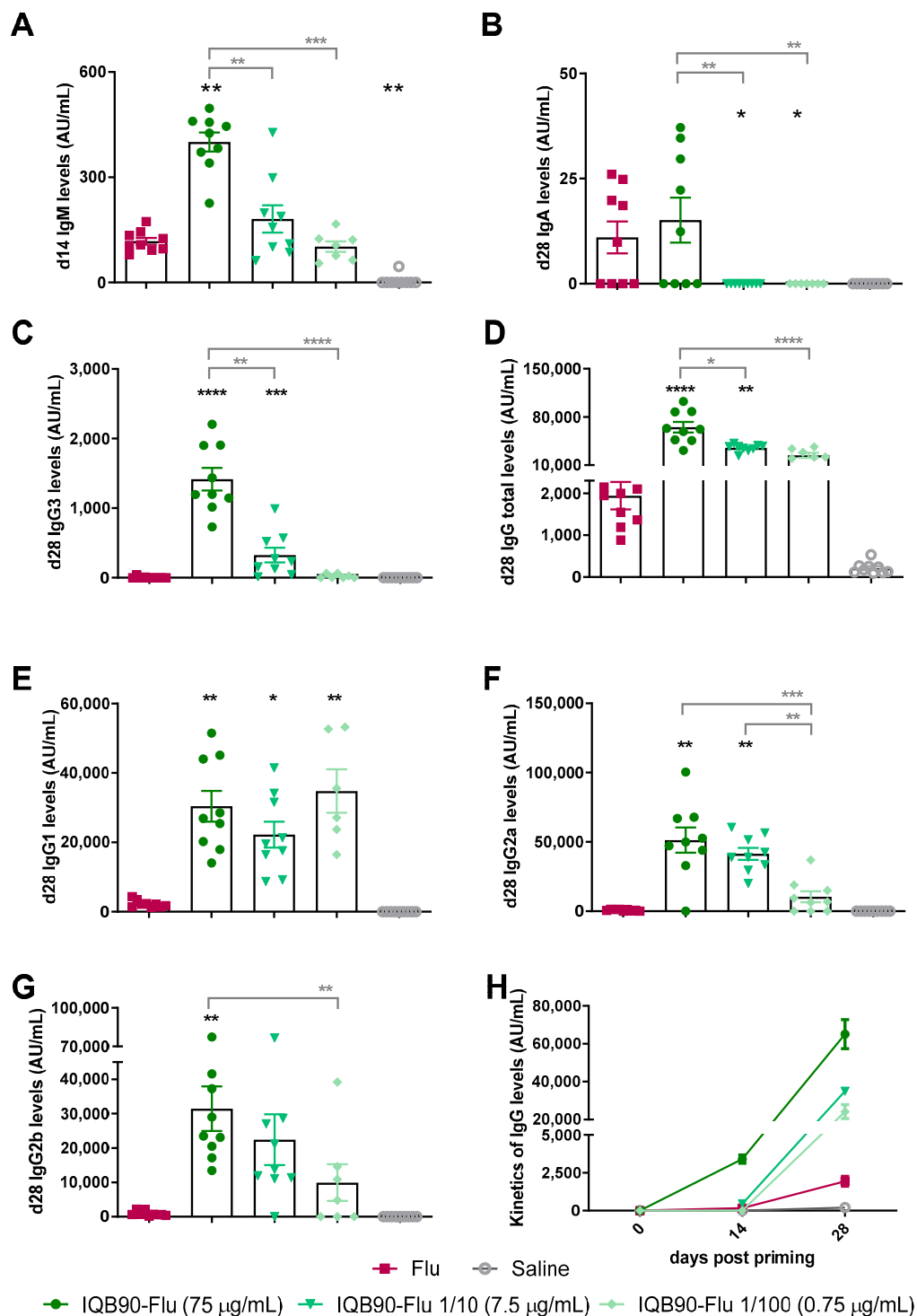


Figure 3. Subcutaneous administration of IQB90-Flu elicited higher antibody levels than the commercial vaccine and promoted a dose-sparing effect. Immunizations were performed subcutaneously at day 0 (priming) and 14 (booster) either with adjuvanted formulation or with no adjuvant. Specific anti-influenza IgM antibody levels 14 days post-priming are shown in (A), and sera IgA antibody levels 28 days post-priming are shown in (B). Total IgG (C), IgG1 (D), IgG2a (E), IgG2c (F), and IgG3 (G) antibodies against influenza antigen were measured in sera 28 days after priming. The kinetics of Total IgG levels is shown in (H). To assess the dose-sparing effect conferred by the IQB90 adjuvant, two groups were inoculated with 1/10 (IQB90-Flu 7.5 µg/mL) and 1/100 (IQB90-Flu 0.75 µg/mL) of the amount of antigen contained in the group inoculated with the unadjuvanted formulation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$, Kruskal–Wallis and Dunn’s post-test (every group against the Flu group are indicated by the black stars, and the adjuvanted groups compared among each other are indicated by grey stars).

No statistically significant differences among adjuvanted groups were observed at day 28 in the antibody levels of IgG1, IgG2a, and IgG2b (Figure 3) in the groups inoculated with 75 and 7.5 µg/mL of HA in IQB90 adjuvanted formulations (Figure 3F,G), indicating that a dose-sparing effect was induced by the IQB90 adjuvant in these cases. In addition, groups inoculated with 7.5 µg/mL of HA were able to induce higher levels of total IgG, IgG1, IgG2a, and IgG3 than the group inoculated with the unadjuvanted formulation (Figure 3D–F,H). However, statistically significant differences (indicated by black stars) were found in IgA levels, where only full dose of IQB90-Flu adjuvanted vaccine (with 75 µg/mL of HA) did not induce significantly lower levels of IgA in comparison with the unadjuvanted formulation (Figure 3B). In addition, differences were detected between the adjuvanted groups in the total IgG and IgG3 antibody levels elicited, indicating that rather than a dose-sparing effect, a dose-dependent effect was observed (Figure 3D,H). In both cases, the formulations containing higher amounts of antigen were able to elicit significantly higher antibody levels. In addition, the formulation containing one-tenth of HA (7.5 µg/mL) was able to elicit higher IgG2a antibody levels than that containing a hundredth of HA (Figure 3F). Therefore, it is important to bear in mind that the dose-sparing effect was maintained when the amount of antigen was decreased 10-fold.

3.4. The Immune Response Elicited by Subcutaneous Injection of IQB90-Flu Vaccines Was Adequate for Conferring Protection against Influenza Infection in Mice

Eliciting IgG2a antibody levels is crucial for influenza (as well as many other) vaccines. This isotype has been shown to play a pivotal role in protection. IgG2a antibodies bind to Fc receptors with higher affinity than to other isotypes, activating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and the opsonophagocytosis mechanisms towards influenza infected cells. When the IgG2a/IgG1 ratio was assessed in the present study, we found that in the case of intranasal immunization, such a ratio was smaller than one (Figure 4A), meaning that higher IgG1 antibody levels were elicited than those of IgG2a. In contrast, the IgG2a/IgG1 ratio elicited by the subcutaneous inoculation of IQB90 adjuvanted vaccine was greater than one (Figure 4B), suggesting that the immune response was polarized towards a Th1 phenotype. This observation is consistent with previous studies by our group in which *Q. brasiliensis* saponin-based adjuvants were used for other viral antigens by subcutaneous route [13–15,18] and for other adjuvanted seasonal influenza experimental [37] or licensed vaccines inoculated subcutaneously [38].

In order to determine the ability of the elicited influenza-specific antibodies to inhibit the hemagglutination, we performed a hemagglutinin inhibition (HAI) assay using turkey RBCs as referred to in Section 2. Antibodies that are able to target the head-domain of HA, preventing the binding of the viral HA to the cellular receptor, are inhibitors of hemagglutination and typically neutralizing. However, it is important to recall that HAI titers do not correlate *perfectly* with protection, though HAI is still considered a *surrogate marker* of vaccine efficacy. Nevertheless, the HAI assay constitutes an appropriate tool to address this issue, even at a clinical level, as it is globally accepted by regulatory agencies such as the FDA [3,39]. Moreover, a demonstration of the HAI response is a requisite for licensing influenza vaccines in the USA [40].

In the present study, the HAI titers were higher in IQB90-Flu adjuvanted vaccines than in the unadjuvanted vaccine, when inoculated either by the i.n. (Figure 4C) or by s/c route (Figure 4D). In addition, no statistically significant differences were observed among groups of mice inoculated subcutaneously with the full amount of antigen and those inoculated with one-tenth of the amount of antigen (Figure 4D). This is of remarkable importance, as it implies that the dose-sparing effect conferred by the IQB90-Flu adjuvant observed in the antibody levels (Figure 3) was effective, as the antibodies elicited with one-tenth of the amount of antigen present in the commercial vaccine were able to induce similar levels of significant HAI titers, thus suggesting potential protection to influenza infections.

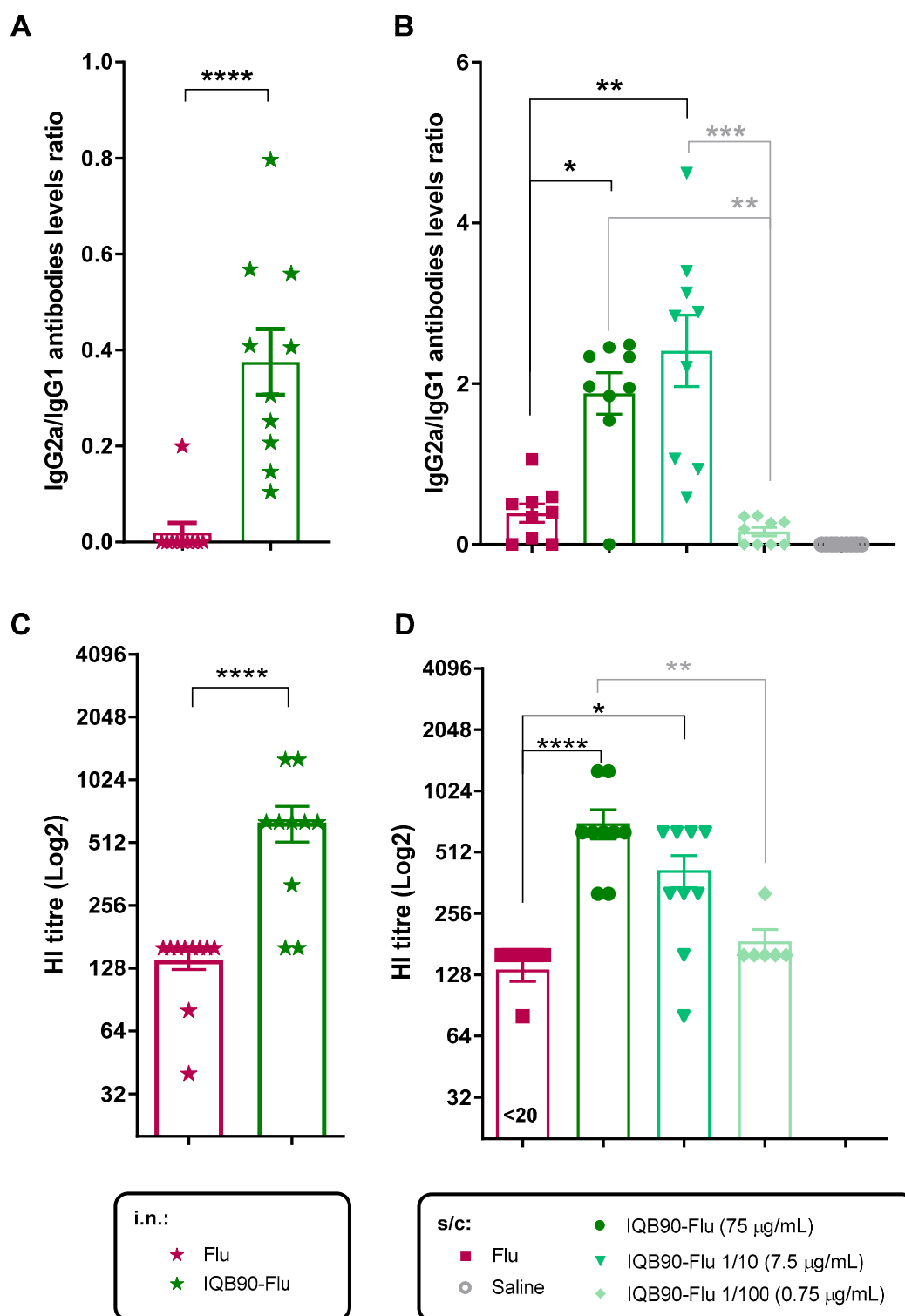


Figure 4. Functionality of humoral response elicited by IQB90 adjuvanted vaccines. IgG2a/IgG1 ratios of antibody levels elicited at day 28 by intranasal (A) or subcutaneous (B) inoculations of IQB90 adjuvanted (green symbols and bars) or unadjuvanted (pink symbols and bars) seasonal influenza vaccines. Antibodies able to inhibit hemagglutination, elicited at day 28 post-priming by i.n. (C) or s/c (D) administration of the adjuvanted or unadjuvanted influenza vaccines, were assessed by HAI as described in Section 2. Statistical analyses to compare the two groups (A,C) were performed using the Mann–Whitney test. When three or more groups were compared (B,D), statistical analyses were performed using the Kruskal–Wallis and uncorrected Dunn’s post-test, comparing every group against the unadjuvanted (Flu) group as the control. Statistically significant differences are considered at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$; black stars indicate Flu, and grey stars are used for comparisons among adjuvanted groups.

Overall, these results indicate that the IQB90-Flu formulations, either at 75 or 7.5 $\mu\text{g/mL}$, were still able to induce important antibody levels and a balanced Th1/Th2 type of immune response, polarized towards the Th1 phenotype when the s/c route was used, which has proven to be effective in conferring protection against seasonal influenza infections [40].

3.5. IQB90-Flu Vaccines Trended to Protect Mice from Influenza

With the aim of assessing whether the elicited immune response by the IQB90-Flu vaccines was protective against influenza infection, s/c or i.n. vaccinated BALB/c mice were subjected to a sub-lethal challenge with 10^3 PFU of A(H1N1)pdm2009, delivered intranasally. After challenge, mice were monitored daily over 14 days for clinical signs of disease (i.e., piloerection, curved back, abnormal behavior, and survival) and weight loss. A group of mice inoculated with saline was maintained as the negative control and also subjected to challenge (Figure 5). In addition, sentinel animals (neither vaccinated nor challenged) were included in all groups to ensure appropriate weight controls (not shown).

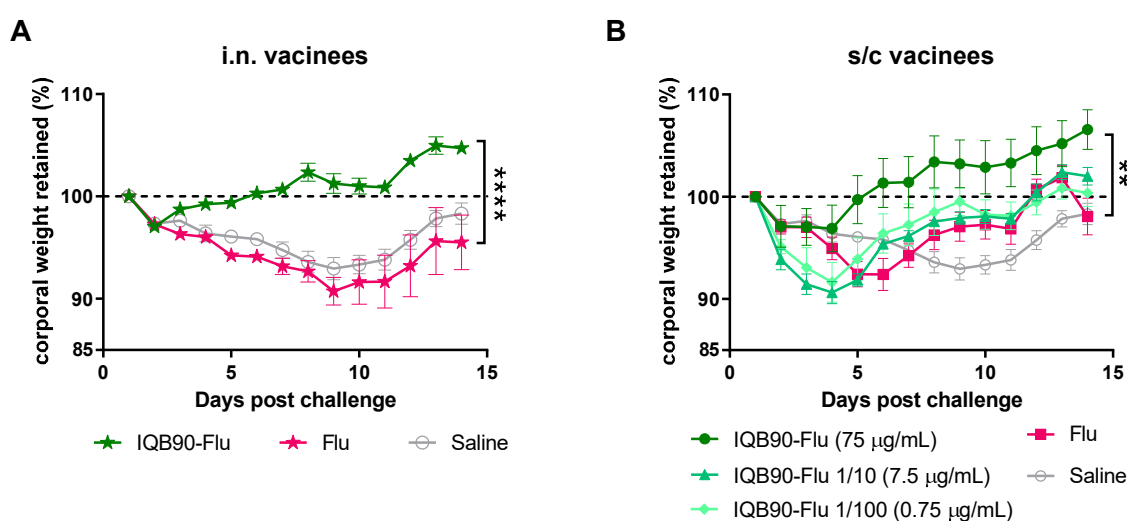


Figure 5. Protective effect of IQB90-Flu vaccines. BALB/c mice were vaccinated twice (two weeks apart, on day 0 and 14), by the i.n. (A) or s/c (B) route. On day 28 post-priming, mice were challenged with a dose of 10^3 PFU of A(H1N1)pdm2009, by the i.n. route. Animals were observed on a daily basis for clinical signs of disease and survival, and their body weight was measured. Corporal weight changes in percentage (mean and error) are shown, considering as 100% their body weight previous to challenge. Statistically significant differences are indicated by black stars: ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$; two-way ANOVA and Fisher's LSD test, comparing every group against the Flu group.

As shown in Figure 5, animals vaccinated with the full dose of antigen (IQB90-Flu 75 $\mu\text{g/mL}$), either by the i.n. (Figure 5A) or s/c route (Figure 5B), were either able to keep their body weight at 100% or gained weight throughout the study, despite a slight weight decrease in the first 2–4 days post-challenge. On the other hand, mice inoculated with unadjuvanted vaccine, either by the i.n. (Figure 5A) or s/c route (Figure 5B), had a rapid decrease in body weight, which did not recover until the end of the assay at 14 days post-challenge. Importantly, mice that received IQB90-Flu containing one-tenth or one-cent of the amount of antigen by the s/c route showed a decrease in their body weight in the days following challenge but recovered rapidly.

3.6. Subcutaneous Administration of IQB90 Elicited High Antibody Levels and Specific ASC in Wild-Type and Casp-1/11 Knockout Mice

Commercial ISCOM-matrices (formulated using *Q. saponaria* saponins) have been reported to activate the NALP-3–ASC–caspase-1 (NLRP3) inflammasome in APCs [41], as well as other particulate adjuvants such as alum [42]. Particularly, *Q. saponaria* saponins activate the NLRP3 inflammasome pathway in LPS-primed macrophages [41]. Previously, we demonstrated that IQB90 induces IL-1 β production in bone-marrow dendritic

cells (BMDCs) in vitro in a caspase-1/11-dependent manner [23]. We ought to determine whether inflammasome complexes are involved in IQB90-Flu vaccine-induced response in vivo. To achieve this, we inoculated caspase-1/11 knockout (ko) or wild type (wt) in C57Bl/6 background mice with two doses (two weeks apart) of either IQB90-Flu, Flu, or saline solution. As shown in Figure 6, IQB90-Flu was able to elicit higher levels of specific anti-influenza total IgG (Figure 6A), IgG1 (Figure 6B), IgG2b (Figure 6C), and IgG2c (Figure 6D) antibodies than the Flu formulation (Figure 6) or the saline-solution inoculated animals (no anti-influenza antibodies detected; not shown). In addition, no statistically significant differences were found between the elicited antibody levels in caspase-1/11 wt and ko mice inoculated with the same formulations (Figure 6A,B,D), with the exception of IgG2b, where antibody levels elicited by IQB90-Flu were higher in wt than in ko mice (Figure 6C). We also assessed the ratio of IgG2c/IgG1 antibody levels in vaccinated C57Bl/6 mice. As shown in Figure 6E, IQB90-Flu was able to trigger a higher IgG2c/IgG1 ratio than the unadjuvanted formulation in an inflammasome independent-manner. This result suggests that IQB90-Flu is able to trigger a balanced Th1/Th2 response in C57Bl/6 mice, while IQB90-Flu vaccinated BALB/c mice elicited a more prominent polarization towards Th1 response (Figure 4B).

In order to further characterize the humoral immune response triggered by these nanoparticle formulations, we measured the number of specific ASCs in splenocytes of inoculated animals. At day 28, two weeks after boosting, splenocytes were obtained aseptically, and anti-influenza IgG ASC were assessed by ELISpot as explained Section 2. As shown in Figure 6F, no statistically significant differences were found between the wt and ko inoculated animals (Figure 6F). However, animals inoculated with IQB90-Flu deployed more influenza IgG-ASC than those inoculated with the unadjuvanted commercial vaccine (Figure 6F). This result is in line with the antibody levels found in sera and was explained previously. However, in further studies, it would be interesting to study the memory cells that can be recruited by animals inoculated with the different formulations once the booster effect has vanished.

3.7. *Casp-1/11 ko Mice Vaccinated with IQB90-Flu Developed a Lower Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) Response Than wt Mice*

The DTH assay has, for a long time, been used to provide an additional measure of CMI towards a specific antigen, and it was assessed for the wt and casp1/11 ko mice as described in Section 2. Figure 6G shows both footpads of a wt mouse vaccinated with IQB90 24 h post i/d inoculation and the elicited DTH reaction. Animals vaccinated with Flu did not show any DTH reaction (Figure 6H,I), like the two mock vaccinated groups (not shown). However, animals vaccinated with IQB90-Flu did show a strong DTH response at 24 h, both in wt and casp-1/11 ko mice (Figure 6H). Forty-eight hours post i/d injection, ko mice showed a diminished DTH reaction ($p < 0.05$) in comparison with that elicited in the wt group (Figure 6I). This suggests that the CMI response triggered by the IQB90-Flu relies, at least in part, on a mechanism involving the Casp-1/11 pathway. Previously, Wilson and co-workers reported that ISCOMATRIXTM nanoparticles (formulated with a *Q. saponaria* purified saponin fraction, CSL) activate the NLRP3 inflammasome, caspase-1 being a key player during such activation [41]. Our results presented herein are in line with previous reports by Detienne and colleagues when assessing the immune response triggered by QS-21 incorporated into cholesterol-containing liposomes: caspase-1/11 was found to be involved in the CMI response but not in the humoral immune response triggered by the saponin QS-21 [43]. Although triggering CMI responses is crucial to tackling intracellular infections, including those caused by the influenza virus, most currently used adjuvants (such as aluminum salts) fail to induce this kind of response. As such, this constitutes a major challenge in the development of new vaccine adjuvants [44]. Commercial saponin-based adjuvants and ISCOM nanoparticles have proven to induce this kind of immune response [8] as well as *Q. brasiliensis* saponins-based adjuvants [13], although their mechanism of action remains to be fully elucidated. Systems analysis and omics (such as proteomics, lipidomics, transcriptomics, systems serology, and metabolomics)

have enhanced the current understanding of vaccine-adjuvants mechanisms over the last years [6]. These have become crucial in order to improve the current understanding of the mechanism of action of these adjuvants. Nonetheless, the induction of a CMI response showed herein by IQB90-Flu constitutes a promising result that demonstrates that it is worth continuing to study and deepen our knowledge to understand this mechanism.

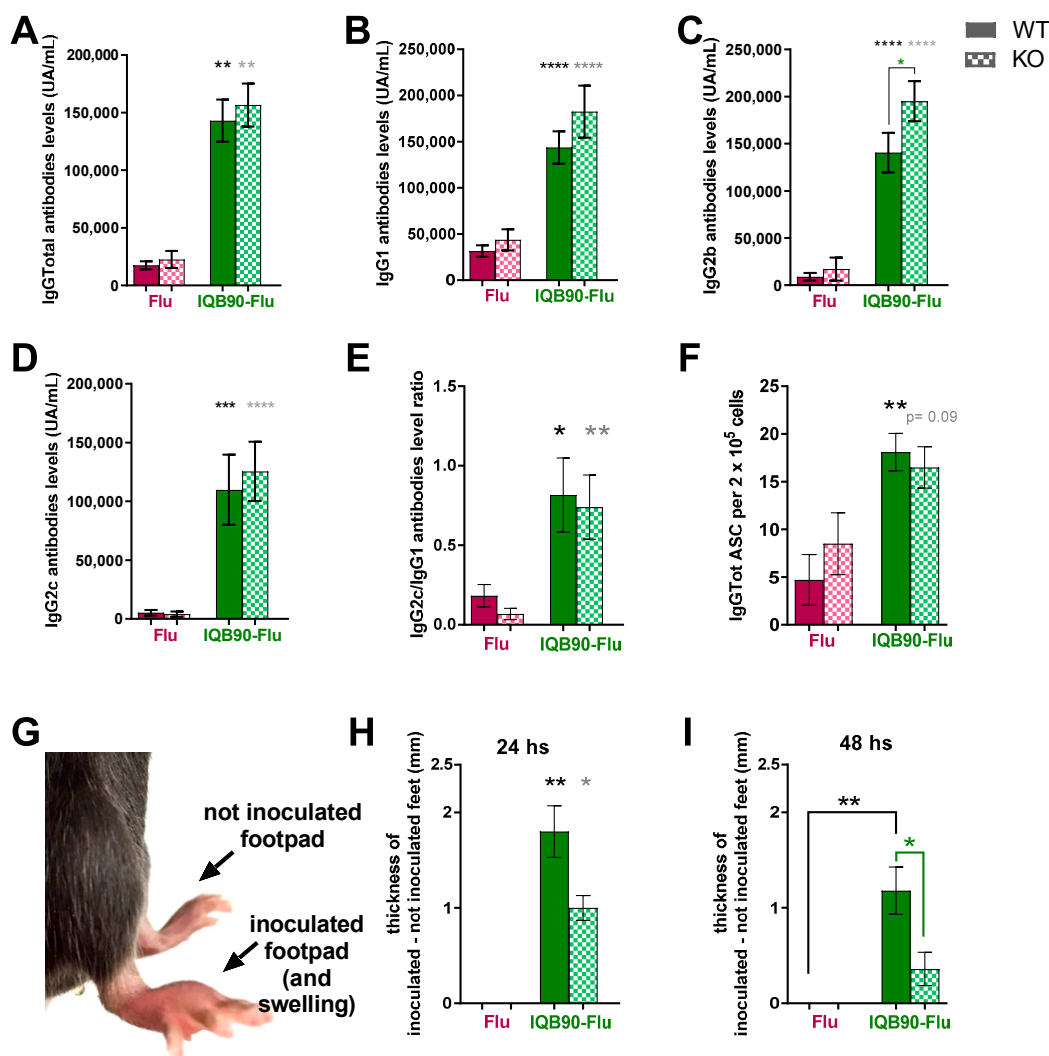


Figure 6. Humoral and cellular immune responses in wt and Casp-1/11 knockout mice inoculated with IQB90-Flu. Female C57Bl/6 mice ($n = 5$) were inoculated subcutaneously on days 0 (priming) and 14 (booster) either with IQB90-Flu (green bars) or the unadjuvanted formulation (Flu, pink bars). Two weeks after booster, humoral, and cellular immune responses were assessed. Specific anti-influenza total IgG (A), IgG1 (B), IgG2b (C), and IgG2c (D) antibody levels were measured in sera at day 28. The IgG2a/IgG1 ratio of antibody levels are shown in (E). At the same time point, splenocytes were obtained aseptically, and specific anti-influenza IgG ASC were assessed by ELISpot (F). The results are expressed as the number of ASC every 2×10^5 splenocytes. To study the CMI response, two weeks after booster, mice were injected with $0.75 \mu\text{g}$ of influenza antigen by the intradermal route at the right hind foot pad. 24 (H) and 48 (I) hours later, the thickness of both the inoculated (right pad) and non-inoculated (left pad) were measured using an electronic caliper. The swelling was calculated as the thickness of the inoculated minus the thickness of the non-inoculated pad; an example of a wt mouse vaccinated with IQB90 and 24 h post-intradermal inoculation is shown (G). Two groups of mice (wt and ko mice, $n = 3$ each) were mock inoculated with saline solution. No swelling was detected after the inoculation of the influenza antigen (the differences between the two footpads were zero for every animal in both the wt and ko groups at 24 and 48 h, data not shown). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$, two-way ANOVA and Fisher's post-test were used to compare between the wt and ko groups (colored stars), and the Kruskal–Wallis test and uncorrected Dunn's post-test were used to compare every group against the unadjuvanted (Flu) group as the control (black stars represent wt and grey stars represent ko groups).

4. Concluding Remarks and Perspectives

Saponin-based adjuvants were actively used in the past for veterinary vaccines, although for toxicity reasons, they were not used in human vaccines. In recent years, technological advances in saponin-fraction purification and nanoparticle formulations for vaccines were able to overcome the toxicity promoted by these molecules, and saponins are gaining attention for use in human health, as remarkable evidence has been gathered regarding their immune-stimulating potential. Importantly, two vaccines containing in the formulation a purified saponin from *Q. saponaria* have been recently approved for humans [9]. However, despite the relentless efforts made in order to improve the yield or find an alternative source for obtaining the saponin fractions from the *Q. saponaria* bark tree, scarcity, ecological threats to trees, yield of saponins obtained from raw material, and lack of reproducibility among batches are still challenges that need to be addressed [9,45]. Considering the similarities but also the comparative advantages of this saponin regarding commercially available *Q. saponaria* saponins, it is of utmost importance to keep working towards the understanding of their mechanism of action and adjuvant effect. In this sense, leaf-extracted *Q. brasiliensis* saponins arise as an alternative and renewable source of saponins.

Regarding the scaling-up of these novel adjuvants, it is important to highlight that the QB-90 fraction used here was obtained following exhaustive standardized procedures already reported [24]. In addition, physicochemical characterization methods were described and validated in order to analyze and quantify the QB-90 saponins fractions obtained [19]. In particular, using LC-MS [46,47], MALDI-TOF [18], and DI-ESI-TOF [17] for the characterization of *Q. brasiliensis* saponins have been previously described as valuable, fast, and cheap tools to analyze saponins fractions.

Although QB-90 saponin fraction is a natural product and, as such, presents an inherent variability, it is important to bear in mind that this drawback has already been overcome for *Q. saponaria* saponins, which are also from natural origin and very similar chemically and, thus, similar processes could be implemented for the large-scale obtainment of *Q. brasiliensis* saponins. Biotechnological methods, standard procedures, and GLP conditions are very powerful tools that have made it possible to systematize the extraction of natural complex products. In terms of ecological impact, *Q. saponaria* saponins require deforestation, as they are obtained from the bark of the trees, causing a large negative impact on the ecosystem. *Q. brasiliensis* saponins, however, are obtained from the leaves of the trees, so their fell is not required, and the forest can regenerate more quickly, which is a major advantage of using this novel adjuvant.

5. Conclusions

Influenza vaccines are key players in reducing seasonal and pandemic influenza burden and severity in a population. Nonetheless, many efforts are being deployed to achieve higher levels of protection, such as for the elderly, for which current commercially-available vaccines are not effective enough [5]. In this matter, the addition of *Q. brasiliensis* saponin-based adjuvants to influenza vaccines, in particular the ISCOM-like nanoparticles formulated with QB-90 saponins, arise as a possibility, as they have proven to increase the potency of the vaccine and to elicit stronger cellular and humoral immune responses than the unadjuvanted influenza vaccine as assessed in this work. In addition, a dose-sparing effect conferred by adjuvants is crucial in order to reduce the amount of antigen needed within vaccines to overcome antigen scarcity, especially when vaccines are highly required, for instance during a pandemic. IQB90-Flu and has proven to confer a ten-fold dose-sparing effect and, thus, could be useful for circumventing this issue.

Many efforts have been deployed in order to overcome the low-yield process and the ecological impact of saponin extraction, which include mass production of *Quijalla* forests [48] and the chemical synthesis of saponins [49]. Although to date it is not possible to obtain great amounts of saponins by either of these methods, their development is of the utmost importance in order to achieve a definitive sustainable source of saponins,

which have proven to be remarkable adjuvants for use in vaccines that could address unmet medical needs such as low immunological response to influenza vaccines by specific populations or preparedness for the next influenza vaccine.

For all these reasons, the results obtained herein with *Q. brasiliensis*-based adjuvants encourage further investigations to move closer to clinical trials in the near future as an alternative to currently available commercial saponin-based adjuvants.

Author Contributions: Conceptualization, M.R.-P., S.P.C. and F.S.; Formal analysis, M.R.-P. and M.M.; Funding acquisition, M.M.; Investigation, M.R.-P., M.M., S.P.C. and F.S.; Methodology, M.R.-P., S.P.C. and F.S.; Project administration, F.S.; Supervision, F.S.; Writing—original draft, M.R.-P.; Writing—review & editing, M.R.-P., M.M., M.B., P.M.R., S.P.C. and F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Uruguay), the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) and the conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). P.M.R. is a CNPq research fellow. M.R.-P. is recipient of a PhD fellowship granted by ANII (fellowship code: POS_NAC_2018_1_151537). M.R.-P. and F.S. are recipients of an ANII research productivity fellowships, initiation and level 1, respectively.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), the Ethics Committee of Universidad de la República (protocol code 468, approved on 9 August 2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Gabriela Casanova and her team at the Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Udelar, for their technical support for obtaining the transmission electron micrographs of ISCOMs. The authors also would like to thank the funding agencies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organisation. Global Influenza Strategy Summary 2019–2030 Influenza. *Glob. Infl. Strateg.* **2019**, *1*, 2.
2. Paules, C.I.; Fauci, A.S. Influenza Vaccines: Good, But We Can Do Better. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, S1–S4. [\[CrossRef\]](#)
3. Hobson, D.; Curry, R.L.; Beare, A.S.; Ward-Gardner, A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg. Lond.* **1972**, *70*, 767–777. [\[CrossRef\]](#)
4. Seibert, C.W.; Rahmat, S.; Krause, J.C.; Eggink, D.; Albrecht, R.A.; Goff, P.H.; Krammer, F.; Duty, J.A.; Bouvier, N.M.; Garcia-Sastre, A.; et al. Recombinant IgA Is Sufficient To Prevent Influenza Virus Transmission in Guinea Pigs. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7793–7804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Tregoning, J.S.; Russell, R.F.; Kinnear, E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, 550–564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. O'Hagan, D.T.; Lodaya, R.N.; Lofano, G. The continued advance of vaccine adjuvants—‘we can work it out’. *Semin. Immunol.* **2020**, *101426*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Dalsgaard, K. Saponin Adjuvants—Isolation of Substance/tom Quillaja saponaria Molina with Adjuvant Activity in Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1974**, *254*, 243–254. [\[CrossRef\]](#)
8. Magedans, Y.V.S.; Yendo, A.C.A.; de Costa, F.; Gosmann, G.; Arthur, G. Foamy matters: An update on Quillaja saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1485–1499. [\[CrossRef\]](#)
9. Lacaille-Dubois, M.A. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* **2019**, *60*, 152905. [\[CrossRef\]](#)
10. Keech, C.; Albert, G.; Cho, I.; Robertson, A.; Reed, P.; Neal, S.; Plested, J.S.; Zhu, M.; Clark, S.C.; Zhou, H.; et al. Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2320–2332. [\[CrossRef\]](#)
11. Heath, P.T.; Galiza, E.P.; Baxter, D.N.; Boffito, M.; Browne, D.; Burns, F.; Chadwick, D.R.; Clark, R.; Cosgrove, C.; Galloway, J.; et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1172–1183. [\[CrossRef\]](#)
12. 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*, 457–460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Cibulski, S.P.; Silveira, F.; Mourglia-Ettlin, G.; Teixeira, T.F.; dos Santos, H.F.; Yendo, A.C.; de Costa, F.; Fett-Neto, A.G.; Gosmann, G.; Roehe, P.M. Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *45*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
14. De Costa, F.; Yendo, A.C.A.; Cibulski, S.P.; Fleck, J.D.; Roehe, P.M.; Spilki, F.R.; Gosmann, G.; Fett-Neto, A.G. Alternative inactivated poliovirus vaccines adjuvanted with Quillaja brasiliensis or Quil-A saponins are equally effective in inducing specific immune responses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105374. [\[CrossRef\]](#)
15. Yendo, A.C.A.; de Costa, F.; Cibulski, S.P.; Teixeira, T.F.; Colling, L.C.; Mastrogiovanni, M.; Soule, S.; Roehe, P.M.; Gosmann, G.; Ferreira, F.A.; 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* **2016**, *34*, 2305–2311. [\[CrossRef\]](#)
16. Silveira, F.; Cibulski, S.P.; Varela, A.P.; Marqu??s, J.M.; Chabalgoity, A.; de Costa, F.; Yendo, A.C.A.; Gosmann, G.; Roehe, P.M.; Fern??ndez, C.; 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*, 9177–9182. [\[CrossRef\]](#)
17. Cibulski, S.; Teixeira, T.F.; Varela, A.P.M.; de Lima, M.F.; Casanova, G.; Nascimento, Y.M.; Fachine Tavares, J.; da Silva, M.S.; Sesterheim, P.; Souza, D.O.; et al. IMXQB-80: A Quillaja brasiliensis saponin-based nanoadjuvant enhances Zika virus specific immune responses in mice. *Vaccine* **2021**, *39*, 571–579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Cibulski, S.; Rivera-Patron, M.; Suárez, N.; Pirez, M.; Rossi, S.; Yendo, A.C.; de Costa, F.; Gosmann, G.; Fett-Neto, A.; Roehe, P.M.; et al. Leaf saponins of Quillaja brasiliensis enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine* **2018**, *36*, 55–65. [\[CrossRef\]](#)
19. Fleck, J.D.; De Costa, F.; Yendo, A.C.A.; Segalin, J.; Dalla Costa, T.C.T.; Fett-Neto, A.G.; Gosmann, G. Determination of new immunoadjuvant saponin named QB-90, and analysis of its organ-specific distribution in Quillaja brasiliensis by HPLC. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 907–910. [\[CrossRef\]](#)
20. Luebert, F. Taxonomy and distribution of the genus Quillaja Molina (Quillajaceae). *Feddes Repert.* **2014**, *124*, 157–162. [\[CrossRef\]](#)
21. Fleck, J.D.; Kauffmann, C.; Spilki, F.; Lencina, C.L.; Roehe, P.M.; Gosmann, G. Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* **2006**, *24*, 7129–7134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Cibulski, S.P.; Mourglia-Ettlin, G.; Teixeira, T.F.; Quirici, L.; Roehe, P.M.; Ferreira, F.; Silveira, F. Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* **2016**, *34*, 1162–1171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Cibulski, S.P.; Rivera-Patron, M.; Mourglia-Ettlin, G.; Casaravilla, C.; Yendo, A.C.; Fett-Neto, A.G.; Chabalgoity, J.A.; Moreno, M.; Roehe, P.M.; Silveira, F. Quillaja brasiliensis saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Yendo, A.; de Costa, F.; Kauffmann, C.; Fleck, J.; Gosmann, G.; Fett-Neto, A. Purification of an Immunoadjuvant Saponin Fraction from Quillaja brasiliensis Leaves by Reversed-Phase Silica Gel Chromatography. In *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*; Fox, C.B., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2017; Volume 1494, pp. 87–93. [\[CrossRef\]](#)
25. Lendemans, D.G.; Myschik, J.; Hook, S.; Rades, T. Immuno-stimulating complexes prepared by ethanol injection. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 729–733. [\[CrossRef\]](#)
26. Lv, J.; Wang, D.; Hua, Y.H.; Pei, S.J.; Wang, J.; Hu, W.W.; Wang, X.L.; Jia, N.; Jiang, Q.S. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 197. [\[CrossRef\]](#)
27. Sun, H.X.; Xie, Y.; Ye, Y.P. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* **2009**, *27*, 4388–4401. [\[CrossRef\]](#)
28. McKenzie, A.; Watt, M.; Gittleson, C. ISCOMATRIX vaccines: Safety in human clinical studies. *Hum. Vaccin.* **2010**, *6*, 237–246. [\[CrossRef\]](#)
29. Cebon, J.S.; Gore, M.; Thompson, J.F.; Davis, I.D.; McArthur, G.A.; Walpole, E.; Smithers, M.; Cerundolo, V.; Dunbar, P.R.; MacGregor, D.; et al. Results of a randomized, double-blind phase II clinical trial of NY-ESO-1 vaccine with ISCOMATRIX adjuvant versus ISCOMATRIX alone in participants with high-risk resected melanoma. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
30. Bigaeva, E.; van Doorn, E.; Liu, H.; Hak, E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154757. [\[CrossRef\]](#)
31. Holmgren, J.; Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **2005**, *11*, S45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. De Magistris, M.T. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 52–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Mitragotri, S. Immunization without needles. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 905–916. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. De Temmerman, M.L.; Reijman, J.; Demeester, J.; Irvine, D.J.; Gander, B.; De Smedt, S.C. Particulate vaccines: On the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 569–582. [\[CrossRef\]](#)
35. Kunda, N.K.; Somavarapu, S.; Gordon, S.B.; Hutcheon, G.A.; Saleem, I.Y. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 325–341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Sjölander, S.; Drane, D.; Davis, R.; Beezum, L.; Pearse, M.; Cox, J. Intranasal immunisation with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Vaccine* **2001**, *19*, 4072–4080. [\[CrossRef\]](#)
37. Tomar, J.; Patil, H.P.; Bracho, G.; Tonniss, W.F.; Frijlink, H.W.; Petrovsky, N.; Vanbever, R.; Huckriede, A.; Hinrichs, W.L.J. Advax augments B and T cell responses upon influenza vaccination via the respiratory tract and enables complete protection of mice against lethal influenza virus challenge. *J. Control Release* **2018**, *288*, 199–211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
38. Podda, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* **2001**, *19*, 2673–2680. [[CrossRef](#)]
 39. Krammer, F.; Smith, G.J.D.; Fouchier, R.A.M.; Peiris, M.; Kedzierska, K.; Doherty, P.C.; Palese, P.; Shaw, M.L.; Treanor, J.; Webster, R.G.; et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 1–21. [[CrossRef](#)]
 40. Reber, A.; Katz, J. Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection. *Expert Rev. Vaccines* **2013**, *12*, 519–536. [[CrossRef](#)]
 41. Wilson, N.S.; Duewell, P.; Yang, B.; Li, Y.; Marsters, S.; Koernig, S.; Latz, E.; Maraskovsky, E.; Morelli, A.B.; Schnurr, M.; et al. Inflammasome-Dependent and -Independent IL-18 Production Mediates Immunity to the ISCOMATRIX Adjuvant. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 3259–3268. [[CrossRef](#)]
 42. Li, H.; Willingham, S.B.; Ting, J.P.-Y.; Re, F. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 17–21. [[CrossRef](#)]
 43. Detienne, S.; Welsby, I.; Collignon, C.; Wouters, S.; Coccia, M.; Delhay, S.; Van Maele, L.; Thomas, S.; Swertvaegher, M.; Detavernier, A.; et al. Central Role of CD169(+) Lymph Node Resident Macrophages in the Adjuvanticity of the QS-21 Component of AS01. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Knudsen, N.P.H.; Olsen, A.; Buonsanti, C.; Follmann, F.; Zhang, Y.; Coler, R.N.; Fox, C.B.; Meinke, A.; D'Oro, U.; Casini, D.; et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19570. [[CrossRef](#)]
 45. Fernández-Tejada, A.; Chea, E.K.; George, C.; Gardner, J.R.; Livingston, P.O.; Ragupathi, G.; Tan, D.S.; Gin, D.Y. Design, synthesis, and immunologic evaluation of vaccine adjuvant conjugates based on QS-21 and tucareol. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22*, 5917–5923. [[CrossRef](#)]
 46. 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*, 644–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 47. 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.* **2017**, *20*, 228–233. [[CrossRef](#)]
 48. Fleck, J.D.; Schwambach, J.; Almeida, M.E.; Yendo, A.C.A.; de Costa, F.; Gossmann, G.; Fett-Neto, A.G. Immunoadjuvant Saponin Production in Seedlings and Micropropagated Plants of *Quillaja brasiliensis*. *Soc. Vit. Biol.* **2009**, *45*, 715–720. [[CrossRef](#)]
 49. Fernández-Tejada, A.; Tan, D.S.; Gin, D.Y. Development of Improved Vaccine Adjuvants Based on the Saponin Natural Product QS-21 through Chemical Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1741–1756. [[CrossRef](#)]

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Quillaja brasiliensis saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses

Samuel Paulo Cibulski^{1,5}, Mariana Rivera-Patron², Gustavo Mourglia-Ettlin³, Cecilia Casaravilla³, Anna Carolina Alves Yendo⁴, Arthur Germano Fett-Neto⁴, José Alejandro Chabalgoity², María Moreno², Paulo Michel Roehe¹ & Fernando Silveira²

Commercially available saponins are extracted from *Quillaja saponaria* barks, being Quil A® the most widely used. Nanoparticulate immunostimulating complexes (ISCOMs or ISCOMATRIX) formulated with these, are able to stimulate strong humoral and cellular immune responses. Recently, we formulated novel ISCOMs replacing Quil A® by QB-90 (IQB-90), a *Quillaja brasiliensis* leaf-extracted saponin fraction, and reported that IQB-90 improved antigen uptake, and induced systemic and mucosal antibody production, and T-cell responses. However, its mechanism of action remains unclear. In this study we provide a deeper insight into the immune stimulatory properties of QB-90 and ISCOMATRIX-like based on this fraction (IMXQB-90). We show herein that, when used as a viral vaccine adjuvant, QB-90 promotes an “immunocompetent environment”. In addition, QB-90 and IMXQB-90 induce immune-cells recruitment at draining-lymph nodes and spleen. Subsequently, we prove that QB-90 or IMXQB-90 stimulated dendritic cells secrete IL-1 β by mechanisms involving Caspase-1/11 and MyD88 pathways, implying canonical inflammasome activation. Finally, both formulations induce a change in the expression of cytokines and chemokines coding genes, many of which are up-regulated. Findings reported here provide important insights into the molecular and cellular mechanisms underlying the adjuvant activity of *Q. brasiliensis* leaf-saponins and its respective nanoparticles.

Vaccination has been one of the most effective tools to reduce morbimortality caused by infectious diseases. A number of vaccines often require the addition of adjuvants to induce adequate immunological stimuli and to achieve protection upon challenge. Adjuvants have been used in veterinary and human vaccines for almost a century in attempting to increase vaccine immunogenicity, largely by activating innate immunity, promoting controlled inflammation and enhancing adaptive immune responses. Limiting residual toxicity and adverse side effects of induced inflammation is a major hurdle for adjuvant use in human vaccines¹, whose mitigation is usually hampered by a limited understanding of their mechanism of action^{2–4}. That is why very few adjuvants are licensed for human use; yet, several formulations are being evaluated in clinical trials^{5,6}.

Evidence has been accumulated suggesting that adjuvants must activate the innate immune system, as a prerequisite for generating a robust and protective adaptive response⁷. Therefore there is still a need for designing novel adjuvants able to adequately modulate the global immune response^{3,8,9}. Triterpenoid saponins, such as Quil A®, extracted from *Quillaja saponaria* Molina, have been widely used as adjuvants for many years in several

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Departamento de Desarrollo Biotecnológico. Instituto de Higiene – Facultad de Medicina, Universidad de la República (Udelar). Av. Alfredo Navarro 3051. CP. 11600, Montevideo, Uruguay. ³Área Inmunología, Departamento de Biociencias/Instituto de Química Biológica – Facultad de Química/Ciencias, Universidad de la República (Udelar). Av. Alfredo Navarro 3051. CP. 11600, Montevideo, Uruguay. ⁴Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Biotecnologia e Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brazil. ⁵Present address: Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Centro de Biotecnologia - CBIOTEC., Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, CEP 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.S. (email: fernandosilveiragonzalez@gmail.com)

vaccines of veterinary use¹⁰. Although these compounds are able to trigger strong cellular and humoral immune responses, their use in human vaccines has been restricted due to undesirable side effects, such as local reactions, haemolytic activity and systemic toxicity^{10,11}. A more purified saponin fraction, also extracted from the bark of the *Q. saponaria*, QS-21 is currently considered “the gold standard” molecule in terms of saponin-based adjuvants¹², is being assessed in clinical trials due to its ability in tailoring Th1-biased immune responses, leading to protection against cancers and intracellular pathogens^{13–16}. However, the mechanism of action by which QS-21 activates cells remains unknown, and the signaling pathways it induces are also still poorly understood^{2–4,12}.

Throughout the last decade our group has been studying the adjuvant properties of saponins from the leaves of *Quillaja brasiliensis* (A. St.-Hil. et Tul.) Mart., a native tree from southern Brazil and Uruguay. Several leaf saponin fractions from *Q. brasiliensis* were found to share structural and biological activities with *Q. saponaria*^{17–20}, inducing lower levels of toxicity than Quil A[®] in mice, and strongly potentiating humoral and cellular immune responses to viral antigens^{18,20–23}. Indeed, these molecules were shown to up-regulate both Th1- and Th2-like immune responses and to promote a robust DTH reaction. QB-90 and QB-80, two of the *Q. brasiliensis* saponin fractions, were shown to increase secretion of Th1-associated cytokines (IFN- γ and IL-2) and antigen-specific IFN- γ production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells^{20,24} when used as vaccine adjuvants.

In order to reduce the undesirable haemolytic activity that invariably accompanies the adjuvant effect of saponins, different colloidal preparations which can also act as antigen delivery systems have been formulated^{9,25–27}. One of such preparations, called immunostimulating complexes (ISCOMs)²⁸ are 40 nm cage-like self-assembled structures combining Quil A[®], cholesterol, phospholipids and antigen. A similar preparation, named ISCOMATRIX[™], is a vaccine adjuvant formulation which does not include the antigen^{29–31}. The physical properties of ISCOM adjuvants contribute to antigen stability, reduce the haemolytic effects associated with saponins, interact with dendritic cells (DCs) and enhance cross-presentation of the incorporated antigen, generating both antibody and CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses^{2,29,31,32}. In summary, ISCOM and ISCOMATRIX[™] vaccines are known to induce long-lasting antibody responses, a balanced Th1/Th2 response, and generation of cytotoxic T lymphocytes in mice^{33,34} and humans^{13,15,35}.

Recently, we reported an alternative ISCOM formulation replacing Quil A[®] by QB-90 (IQB-90). This formulation with reduced haemolytic activity was efficiently uptaken *in vitro* by murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). Moreover, subcutaneously inoculated IQB-90 induced strong serum antibody responses to ovalbumin, robust DTH reactions, significant T cell proliferation and increased Th1 (IFN- γ and IL-2) cytokine responses. Similarly, intranasally delivered IQB-90 elicited serum IgG and IgG1, and mucosal IgA responses at distal systemic sites, even with low antigen doses³⁴. Despite the fact that ISCOMs and ISCOMATRIX[™] have been studied for nearly 30 years, the mechanisms of action of such nanoparticles are still not clearly understood^{2,31,36}.

The understanding of saponin-based adjuvants mode of action, and in particular of those derived from *Q. brasiliensis* leaves, is highly relevant, as they constitute a more readily renewable alternative source of saponins and also present reduced toxicity compared to *Q. saponaria* bark-derived saponins. Therefore, the aim of the present work is to provide a deeper insight into the molecular mechanisms of action of QB-90 and its nanoparticle formulations. We will focus on the interaction with innate immunity receptors, as well as in the characterization of early immune events, such as cell recruitment and cytokine/chemokine profile, triggered by *Q. brasiliensis* saponin-based adjuvant.

Results

QB-90 saponins promote a transient immunocompetent environment lasting 24 hours regardless the adjuvant-antigen mixture. In order to assess if the mechanism of action of QB-90 was independent of the presence of antigen, BVDV antigen was injected in mice into proximal as well as distal sites, either at the same time or 24 and 48 hours before or after the administration of QB-90. As shown in Fig. 1, QB-90 was able to induce a strong immune response characterized by high antigen-specific antibody titers (IgG1 and IgG2a) and robust delayed type hypersensitivity (DTH) reaction, when administered at the same site 24 hours earlier or at the same time of the BVDV antigen. However, if the adjuvant was administered 48 hours before, or at distal injection sites, no adjuvant effect was observed. It is important to highlight, that no adjuvant effect was observed when QB-90 was administered 24 or 48 hours after the BVDV antigen administration (data not shown).

These findings suggest that the adjuvant QB-90 is able to trigger a transient (lasting 24 hours) and local immunocompetent environment that could be exploited by a subsequent administration of antigen. These data also suggest that QB-90 mechanism of action is independent of binding to BVDV antigen, but in order to trigger a systemic immune response, antigen should be administered up to 24 hours after the inoculation of QB-90, and in a proximal injection site.

Increased cell numbers in spleen and dLNs after QB-90 or IMXQB-90 administration without antigen. At 24 and 48 hours post subcutaneous inoculation (hpi) of either QB-90 or IMXQB-90, single-cell suspensions were prepared from spleen and dLNs. Spleens from QB-90 and IMXQB-90-treated mice (Fig. 2A) showed a significantly increased number of cells when compared to mock controls at 24 and 48 hours ($p < 0.001$). However, when comparing 24 and 48 hpi among each group (QB-90 and IMXQB-90), statistically significant differences were observed only in the QB-90-inoculated group.

In dLNs from both QB-90 and IMXQB-90 treated mice (Fig. 2B), a significant increase in cell numbers was detected at 24 hpi ($p < 0.001$). However, at 48 hpi only the IMXQB-90-treated mice showed a significantly increased number of cells when compared to the control group ($p < 0.01$), although the number was significantly lower than that observed at 24 hpi.

QB-90 and IMXQB-90 recruits and activates immune cells in spleen and dLNs. In spleen, neutrophils (Gr1^{high}), Natural Killers (NK; CD49⁺CD3⁺), B cells (CD19⁺) and T cells (identified as CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺) populations were higher in QB-90 and IMXQB-90-inoculated mice than in those of the mock (saline) inoculated group at 24 and 48 hpi (Fig. 3A–F left axis). Moreover, the dendritic cells (DCs) population,

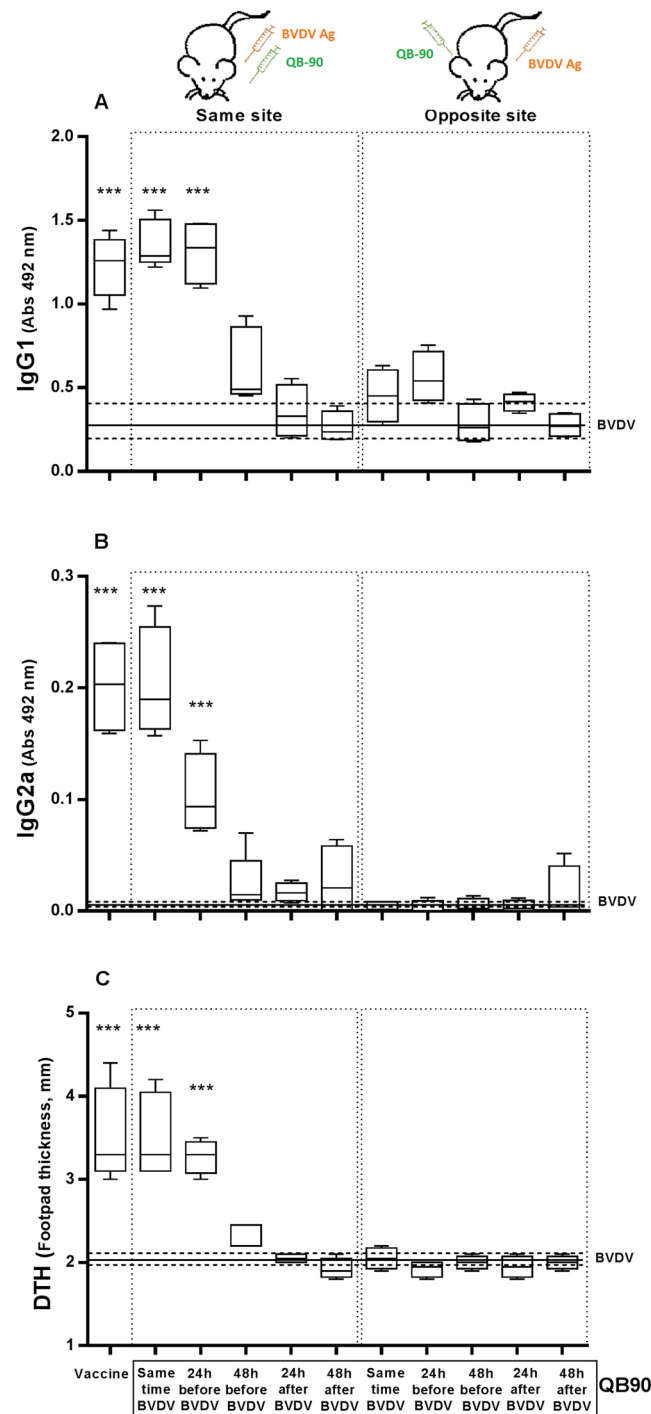


Figure 1. QB-90 adjuvant activity is independent of antigen-adjuvant mixture, but these should be administered in the same site. Female CF1 mice ($n=5$) were subcutaneously immunized in the hind limb twice (0 and 14 day) at two weeks intervals with BVDV antigen and QB-90. Groups were inoculated with QB-90 and with BVDV antigen separately, either in the same or opposite sites, and at the same time or with different time points (BVDV antigen was inoculated simultaneously or 24 or 48 hours after the QB-90 inoculation). In addition, a group of mice was inoculated with the formulated vaccine (containing BVDV antigen and QB-90 as adjuvant). IgG1 (**A**) and IgG2a (**B**) anti-BVDV antibodies titers and DTH responses (**C**) at day 28 are shown in box-and-whiskers. Horizontal continuous lines represent median values in mice inoculated with BVDV alone, and dashed lines represent maximum and minimum values in the same group. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test (***) denotes $p < 0.001$, in relation to animals immunized with BVDV alone).

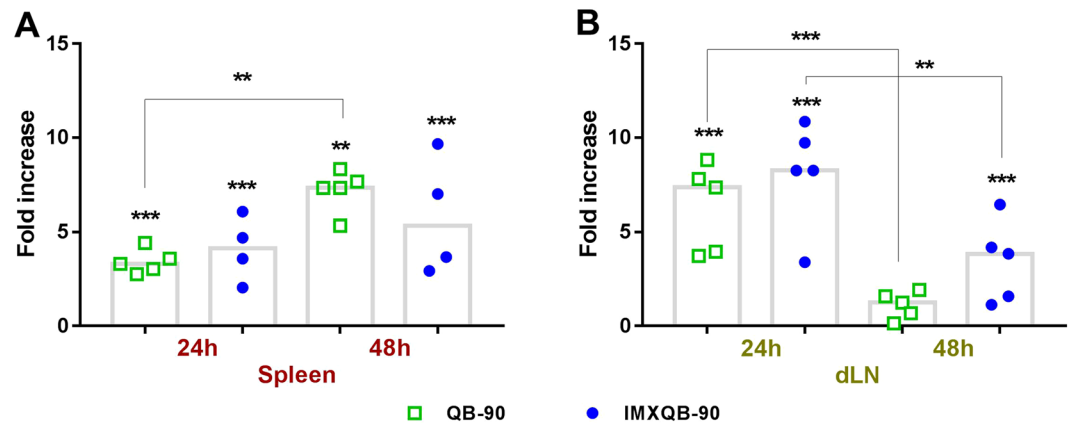


Figure 2. Cell count in spleen and dLNs of QB-90 and IMXQB-90 treated mice. Mice were injected at the base of the tail with QB-90 (10 µg), IMXQB-90 (2.5 µg of QB-90) or saline solution. After 24 and 48 hours post injection (hpi), cell counts were performed in spleen (A) and dLN (B), and expressed as fold increase regarding the saline inoculated group, using median values ($n = 4-5$) of each group. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Statistically significant differences in cell numbers between QB-90, IMXQB-90 and saline-inoculated mice are indicated with (* $p < 0.05$), (** $p < 0.01$); (***) $p < 0.001$).

identified as CD11c expressing MHC class II, were significantly increased in IMXQB-90-treated mice, though only at 48 hpi ($p < 0.05$, Fig. 3C left axis).

In dLNs of mice that received either QB-90 or IMXQB-90, neutrophils, NKs, DCs, B cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells were significantly increased at 24 and 48 hpi (Fig. 3A–F right axis), with the exception of NK cells from the IMXQB-90 group at 48 hpi. Altogether, results showed that QB-90 and IMXQB-90-inoculations induce significant increase in cell numbers in both spleen and dLN.

Taken together, these results show that the early increased cell counts evidenced earlier is associated with an increase in neutrophils, NKs, DCs, B and T cell populations.

Differential modulation of gene expression at dLN by QB-90 and IMXQB-90 vaccine adjuvants formulations. The expression of ninety two genes related to immune function in dLN was analyzed by qPCR (TaqMan[®] Mouse Immune Array Applied Biosystems) 24 hpi with QB-90, IMXQB-90 or saline solution as mock control. In the QB-90-treated group 45 genes were differentially expressed whereas in IMXQB-90-treated group these amounted to 23, in comparison with the mock group, as shown in the Venn's diagram (Fig. 4A) and in the gene-expression heatmap (Fig. 4B).

The most prominent gene differential expression was detected in QB-90-treated mice, and involved the up-regulation of *Ccr7*, *Cd28*, *Il-12b*, *Il-1β*, *Nos2*, *Prf1* and *Lif* and the down-regulation of *Il-7* and *Fn1*. In addition, and up-regulation of several genes coding for the costimulatory molecules, such as *Cd40*, *Cd40lg*, *Cd80* and *Cd86*, was noticed.

In IMXQB-90 inoculated mice, only four genes showed differential expression in relation to QB-90 inoculated mice gene expression: *Il-2* and *Il-4* were down-regulated while *Il-9* and *Lta* were up-regulated. Nineteen genes were found differentially expressed in both groups (Table 1). Regarding the chemokine gene expression, three genes were found to be up-regulated in both treated groups: *Ccl2*, *Ccl3*, and *Cxcl10*. In addition, *Csf2*, *Ctla4*, *Ifn-γ*, *Il-10*, *Il-15*, *Il-5*, *Il-6* and *FasL* expression was found to be increased (Table 1). Six other genes were up-regulated: *Fas*, *Edn1*, *Ptgs2*, *Socs1*, *Stat1* and *Gzmb*. On the contrary, *Lpr2* was down-regulated in both treated groups. In order to better understand the molecular and cellular interactions between the differentially expressed genes in both groups we analyzed them as a query gene set using the web-based network tool STRING. Results indicate that nearly all genes differentially expressed in the context of QB-90 and IMXQB-90 inoculation are part of well-defined interaction networks (Fig. 4C). The analysis clearly shows that our proteins have more interactions among themselves than what would be expected for a random set of proteins (Protein-protein interactions enrichment p -value: $< 1.0 \times 10^{-16}$). The STRING analysis revealed the functional links between different proteins involving functions as “response to LPS” (GO:0032496), “immune response” (GO:0006955), “response to bacterium” (GO:0009617), “cellular response to LPS” (GO:0071222) and “positive regulation of cell proliferation” (GO:0008284). All cellular processes were identified with high confidence, as predictions showed a low false discovery rate ($< 1.47 \times 10^{-14}$).

Considering these results as a whole, QB-90 and IMXQB-90 were able to induce a differential expression pattern of cytokines, chemokines and costimulatory molecules which are particularly relevant in triggering early immune responses in dLNs, and thus, for creating a proinflammatory environment which is essential to orchestrate an effective and long-lasting immune response.

QB-90 and IMXQB-90 promote a Th1-type cytokine profile. To better characterize the immunocompetent status elicited by QB-90 and IMXQB-90, the cytokine profile induced by these formulations was assessed in mice. Cytokines obtained from sera at 24 and 48 hpi were analyzed using a Th1/Th2/Th17 Cytokine Bead Array (BD). Although IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17 and IL-10 production levels were assessed, only IFN- γ and

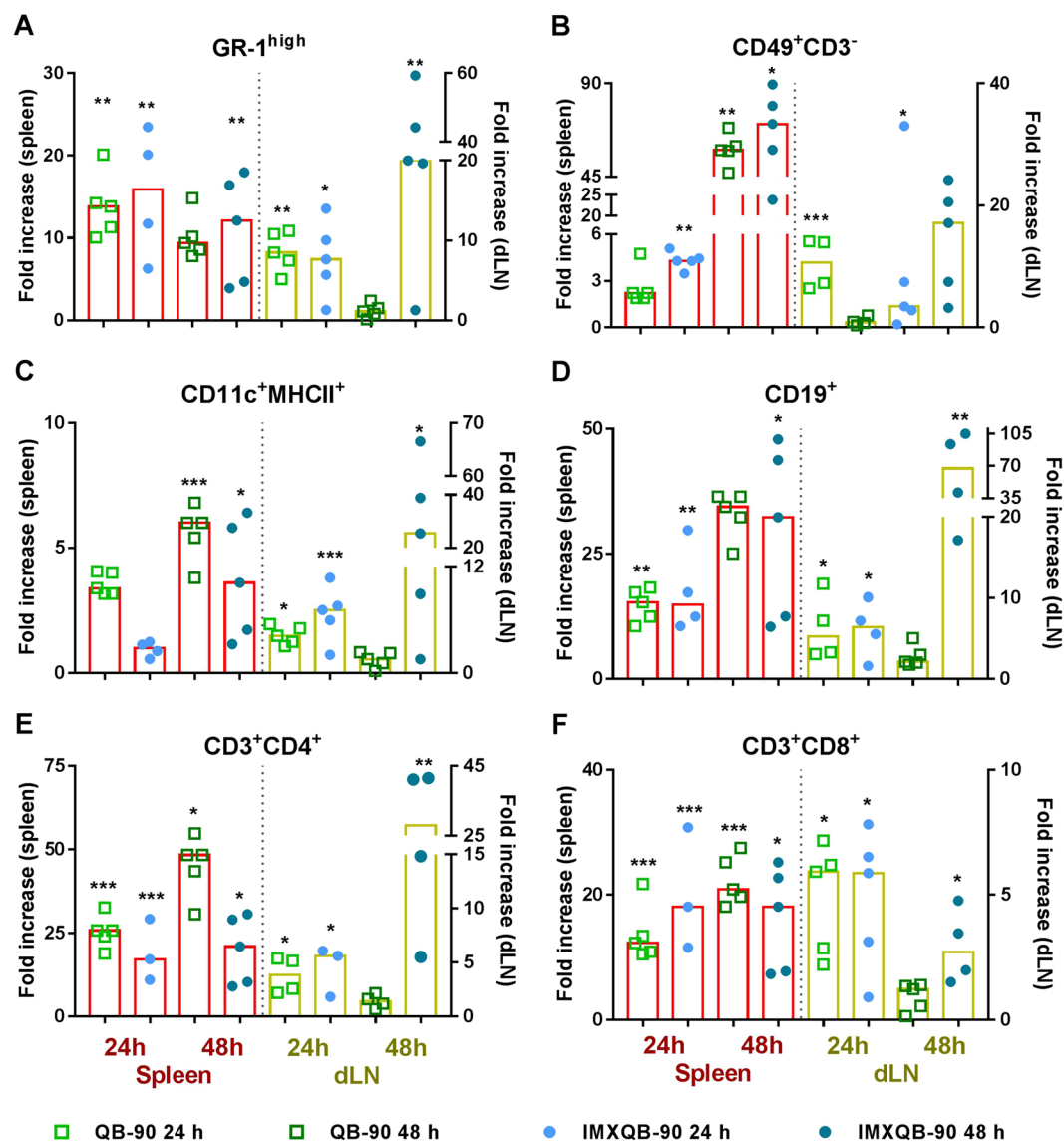


Figure 3. Cell populations in spleen and dLNs after inoculation of saponin-based adjuvants. QB-90 (10 μ g), IMXQB-90 (2.5 μ g of QB-90) or mock (saline solution) controls were subcutaneously injected at the base of the tail and at 24 and 48 hpi cells were collected and analyzed by flow cytometry. Spleen cell populations are shown in the left axis (red bars), and dLNs cell populations are shown in the left axis (yellow bars). Fold increase values regarding the mock control group were calculated using median values ($n = 4-5$). Statistically significant differences between adjuvants and saline treated mice were determined using Kruskal-Wallis test with Dunn's post test, and are indicated with (* $p < 0.05$); (** $p < 0.01$); (***) $p < 0.001$).

TNF- α were detectable in sera obtained at 24 hpi. Similar levels of INF- γ were found in either QB-90 or IMXQB-90-sensitized mice (Fig. 5A, $p < 0.01$). TNF- α was significantly increased only in QB-90-inoculated mice (Fig. 5B, $p < 0.05$). None of the assessed cytokines were detected at 48 hpi.

QB-90 and IMXQB-90 induce IL-1 β production by BMDCs *in vitro* in a Caspase-1/11 dependent manner. BMDCs were obtained from C57BL6 WT mice and primed with the TLR4-agonist LPS (10 ng/mL) during 2 hours. Then, the cells were stimulated with increasing concentrations of QB-90 or IMXQB-90 (10, 2.5 and 0.5 μ g/mL) and the production of IL-1 β was analyzed in cell culture supernatants. In the presence of LPS, both QB-90 and IMXQB-90 (10 and 2.5 μ g/mL) enhanced the production of IL-1 β , suggesting that both preparations activate the canonical inflammasome pathways (Fig. 6A,C). It is worth to mention that after stimulation with alum (50 μ g/mL), a known NLRP3 inflammasome activator used as control, IL-1 β production levels were lower than after IMXQB-90 stimulation in lower doses (Fig. 6D).

Interestingly, in the absence of LPS, QB-90 was not able to induce the IL-1 β production at none of the assessed concentrations (Fig. 6B) while IMXQB-90 induced a high production of the cytokine (both at 10 and 2.5 μ g/mL; Fig. 6D). Cell viability after incubation remained unchanged ($\geq 90\%$) in all cases (data not shown).

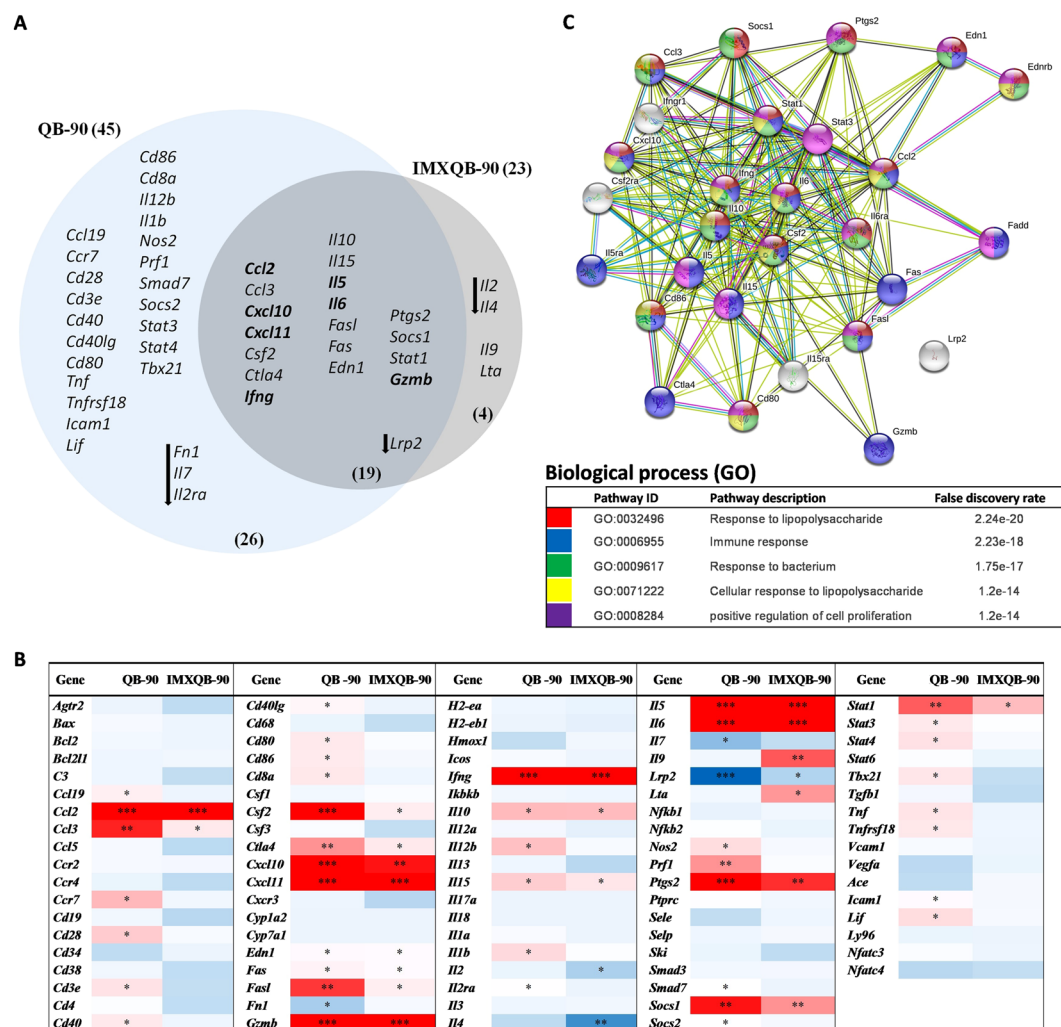


Figure 4. Cytokines and chemokines genes were up-regulated in the dLNs of mice 24 h after QB-90 and IMXQB-90 adjuvant administration. (A) Venn's diagram showing the distribution of genes differentially expressed at least $\geq$ two fold by QB-90 ($n = 45$) and IMXQB-90 ($n = 23$) treated groups were compared to a mock control (saline solution inoculated group). The total number of up-regulated genes (26, 19, 4) is indicated. The arrows show down-regulated genes. Genes up-regulated ≥ 10 -fold are also bolded. (B) Heatmap of the differential gene expression analysis of the immune related genes in dLN of mice 24 h after QB-90 and IMXQB-90 adjuvant administration. RNA extracted from the dLN 24 h after injection of either QB-90- or IMXQB-90 were analyzed by qPCR (TaqMan[®] Mouse Immune Array, Applied Biosystems). Red boxes: upregulation; blue boxes: downregulation. * refers to twofold variations ($\geq$ or $\leq$ 2); ** five-fold $\geq$ 5; *** ten-fold $\geq$ 10. (C) STRING network analysis of genes differentially expressed in dLNs of mice after QB-90 and IMXQB-90 administration. The identified genes from Table 1 were entered into the STRING database (<https://string-db.org/>). Proteins are represented as nodes. Node colors represent the different types of pathways in which proteins are involved (showed at the bottom of the figure). The STRING confidence level was set to 0.4 (medium).

Then, we sought to determine if the IL-1 β production induced by both QB-90 and IMXQB-90 was a consequence of the canonical inflammasome pathways activation. To that end, BMDCs derived caspase-1/11 KO and WT C57BL/6 mice were stimulated with 10 μ g/mL of QB-90 or IMXQB-90 after 2 hours priming with LPS (10 ng/mL), and IL-1 β production was measured. In the presence of LPS both QB-90 and IMXQB-90 (10 μ g/mL) induced the production of IL-1 β in WT BMDCs, nonetheless, this production was not seen in caspase-1/11 KO BMDCs (Fig. 6E). No differences were observed among groups when cells were not primed with LPS (Fig. 6F). These results indicate that the observed production of IL-1 β is dependent on Caspase-1/11, and that both preparations would be able to activate canonical inflammasome pathways³⁷.

QB-90 and IMXQB-90 induce proinflammatory responses through MyD88 pathways in a TLR-independent manner. In order to investigate the mechanisms by which QB-90 and IMXQB-90 trigger proinflammatory responses, reporter cell lines Raw Blue[™] expressing many pattern recognition receptors (PRR), THP1-XBlue[™], expressing functional myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) adaptor molecule,

Gene	Gene name	Group	QB-90*	IMXQB-90*
<i>Ccl2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	Chemokine	17,2	12,5
<i>Ccl3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3		8,7	2,6
<i>Cxcl10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10		15,2	9,2
<i>Cxcl11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11		69,8	32,4
<i>Csf2</i>	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Cytokine	10,3	2,5
<i>Ctla4</i>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4		5,1	2,6
<i>Ifng</i>	interferongamma		20,4	11,3
<i>Il10</i>	interleukin 10		3,9	3,9
<i>Il15</i>	interleukin 15		3,4	2,7
<i>Il5</i>	interleukin 5		47,2	100,7
<i>Il6</i>	interleukin 6		22,9	28,3
<i>Fasl</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)		7,9	2,5
<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Cytokine receptor	2,3	2,2
<i>Edn1</i>	endothelin 1	Peptidehormone	2,2	2,2
<i>Ptgs2</i>	prostaglandin-endoperoxidesynthase 2	Synthase	16,6	8,2
<i>Socs1</i>	Suppressorofcytokinesignaling 1	Kinasemodulator	9,2	5,1
<i>Stat1</i>	signal transducer and activator of transcription 1	Transcriptionfactor	6,7	3,9
<i>Gzmb</i>	granzyme B	Serine protease	42,5	10,8
<i>Lrp2</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 2	Unclassified	−13,1	−2,0

Table 1. Genes differentially expressed in both treatments: QB-90 and IMXQB-90. *Refers to fold change variations.

and THP1-XBlue™ defMyD cell-line (expressing only non-functional MyD88) were stimulated with the adjuvant preparations.

As shown in Fig. 7A, none of the tested concentrations (100% of cell viability) for both adjuvant formulations showed interaction with any of the PRRs expressed by Raw Blue™ cells. In order to evaluate whether QB-90 or IMXQB-90 may signal through MyD88, THP-1 and THP1-XBlue™-defMyD reporter cell lines were stimulated with either QB-90 or IMXQB-90. Both formulations were able to activate the reporter gene (SEAP) in THP1-XBlue™ at 0.39 and 1.56 µg/mL (Fig. 7B). However, stimulation of THP1-XBlue™-defMyD occurred only at a concentration of 1.56 µg/mL (Fig. 7C). Of note, cell viability was assessed by MTT assay and 100% of viability was observed up to 0.39 µg/mL of saponins. Hence, the activation observed in both cell lines at 1.56 µg/mL can be attributed to cell cytotoxicity and the subsequent induction of danger signals (DAMPs) that augment immune responses^{1,2} (right Y axis Fig. 7A,B). As shown in Fig. 7D, when comparing the signal elicited in THP1-XBlue™ and THP1-XBlue™-defMyD cell lines stimulated with 0.39 µg/mL (100% of viability) of either QB-90 or IMXQB-90, it becomes evident that these formulations were able to activate the reporter gene in THP-1 cells, but not in cells lacking the MyD88 adaptor molecule. Altogether, these results suggest that the both *Q. brasiliensis* saponin based formulations interact with monocytes or macrophages in a TLR-independent but MyD88-dependent manner.

Discussion

Adjuvants are essential components of modern vaccines since they contribute to the initiation of the innate immune response to antigens^{3,7}. Furthermore, they stimulate the production of cytokines by resident innate cells, which in turn leads to the rapid recruitment of neutrophils, monocytes and dendritic cells (DCs) that uptake and present antigens^{35,38,39}. Adjuvant potential of plant-derived compounds has been largely explored. In particular, saponins (e.g., QS-21) or saponin-based formulations as ISCOMs or ISCOMATRIX™ have shown to be safe in animal and human clinical studies and to be well tolerated by humans^{13,27,35,40}. When administered subcutaneously, such adjuvants have shown to trigger powerful immune responses, characterized by the induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, balanced Th1/Th2 cytokine responses, as well as robust and persistent antibody responses^{30,31,35}. In addition, they have proven to be highly effective when delivered via mucosal surfaces^{22,31,34}. However its mechanism of action is still poorly characterized^{2,31,35}.

Herein we show that QB-90, a *Quillaja brasiliensis* leaf-extracted saponin fraction, is efficient in inducing adjuvant effect in mice even when administered up to 24 hours before the inoculation of the antigen, provided the antigen is administered at the same inoculation site. However, when the antigen is inoculated before the adjuvant, such effect is not observed. This interesting finding reveals that QB-90 is capable to promote a local and transient immunocompetent environment. This behavior is also observed in other adjuvants successfully used in human vaccines such as alum^{41,42} and MF59⁴³. In conclusion, the findings reported here support that QB-90 is a potent adjuvant with the ability to stimulate a systemic immune response and promote a local and transient immunocompetent environment.

In order to provide a deeper understanding of the mechanisms underlying the generation of the immunocompetent environment, the immune cell recruitment in spleen and dLNs was examined in mice 24 and 48 hpi of QB-90 or IMXQB-90 without antigen. Our results show that either QB-90 or IMXQB-90 inoculation significantly increase spleen cellularity, suggesting a possible rapid drainage from the injection site. Spleen cell influx

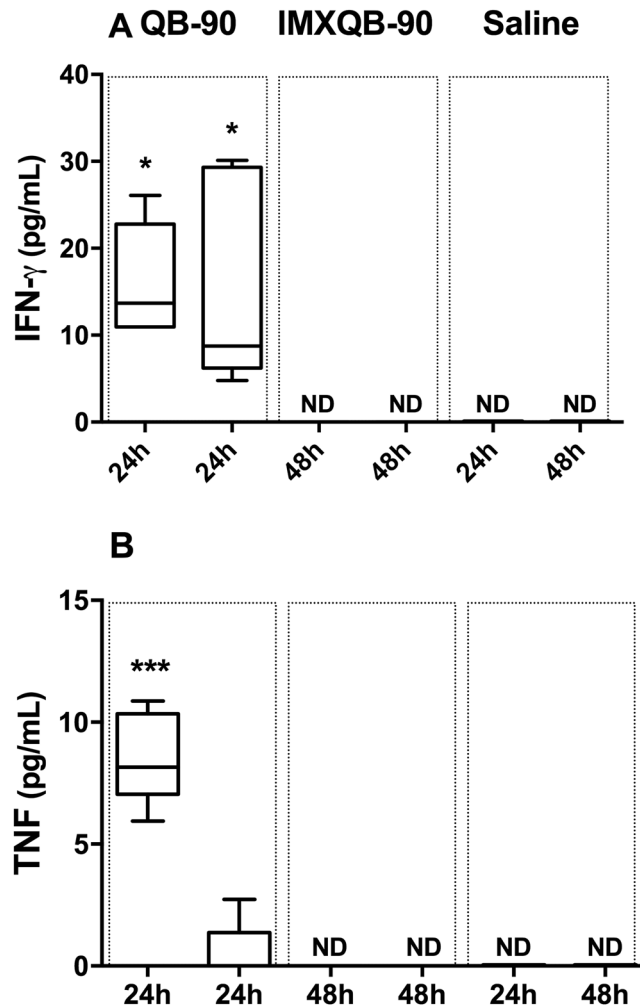


Figure 5. IFN- γ and TNF- α production in mice sera at 24 and 48 hpi. IFN- γ (A) and TNF- α (B) production were measured by a Cytometric Bead Array (BD) 24 and 48 hours post-inoculation with QB-90 (10 μ g) or IMXQB-90 (2.5 μ g) in sera of sensitized mice. Cytokine levels expressed in pg/mL are shown in box-and-whiskers, and median of each group is indicated by a line. Statistically significant differences between adjuvants and saline treated mice were determined using Kruskal-Wallis test with Dunn's post test and are indicated with (* $p < 0.05$); (** $p < 0.01$); (***) $p < 0.001$).

continues at least up to 48 hours after inoculation of QB-90. In the dLN, both formulations induce an early influx of cells 24 hpi that rapidly decay 24 hours later, being still increased at 48 hpi only in IMXQB-90 inoculated mice. These findings can be explained by the nature of each adjuvant-formulation. As ISCOMs-like structures act as an antigen-delivery system and also are particulate immunostimulatory compounds, they are able to induce a more durable cellular recruitment at the dLNs, than the soluble saponin adjuvant, which is essential to trigger an effective and long-lasting immune response³¹. The above results confirm and extend our previous reports, in which mice treated with ISCOMs-adjuvanted vaccines promoted higher antibodies titers than those inoculated with saponin-adjuvanted vaccines, both in *Q. brasiliensis* and commercially available saponins³⁴.

When the recruited cells populations were characterized by flow cytometry, an increase in neutrophils, DCs, NKs, B- and T-cells was found in QB-90 and IMXQB-90 treated mice in comparison with the mock control. Interestingly, dLN DCs (CD11b⁺ MHCII⁺) are transiently increased in both inoculated groups at 24 hpi, and their number rapidly decreases for the QB-90 inoculated group, but is still increased in the IMXQB-90 treated group at 48 hpi. On the other hand, splenic DCs behave differently: their number do not increase at 24 hpi, but is significantly augmented in both groups at 48 hpi. The observed behaviour in DCs populations might be explained by the fact that when activated by either QB-90 or IMXQB-90 adjuvants, dLNs DCs may rapidly migrate from dLN to spleen, in order to provide a further activation of immune effector cells. ISCOMs and ISCOMATRIXTM are known to enhance antigen uptake, and induce dLNs DCs activation, resulting in later strong antibody and T cell responses^{2,34,37,44}. Our results are in line with previous reports which have proven that ISCOMATRIXTM particles rapidly move to the dLN within the first 2 h after injection in mice, where it can be loaded into dLN-resident DCs and other antigen presenting cells (APCs)³¹. Another work emphasized that DCs and APCs at the injection site also transfer captured ISCOMATRIXTM particles from the injection site into the dLN, thus, providing two

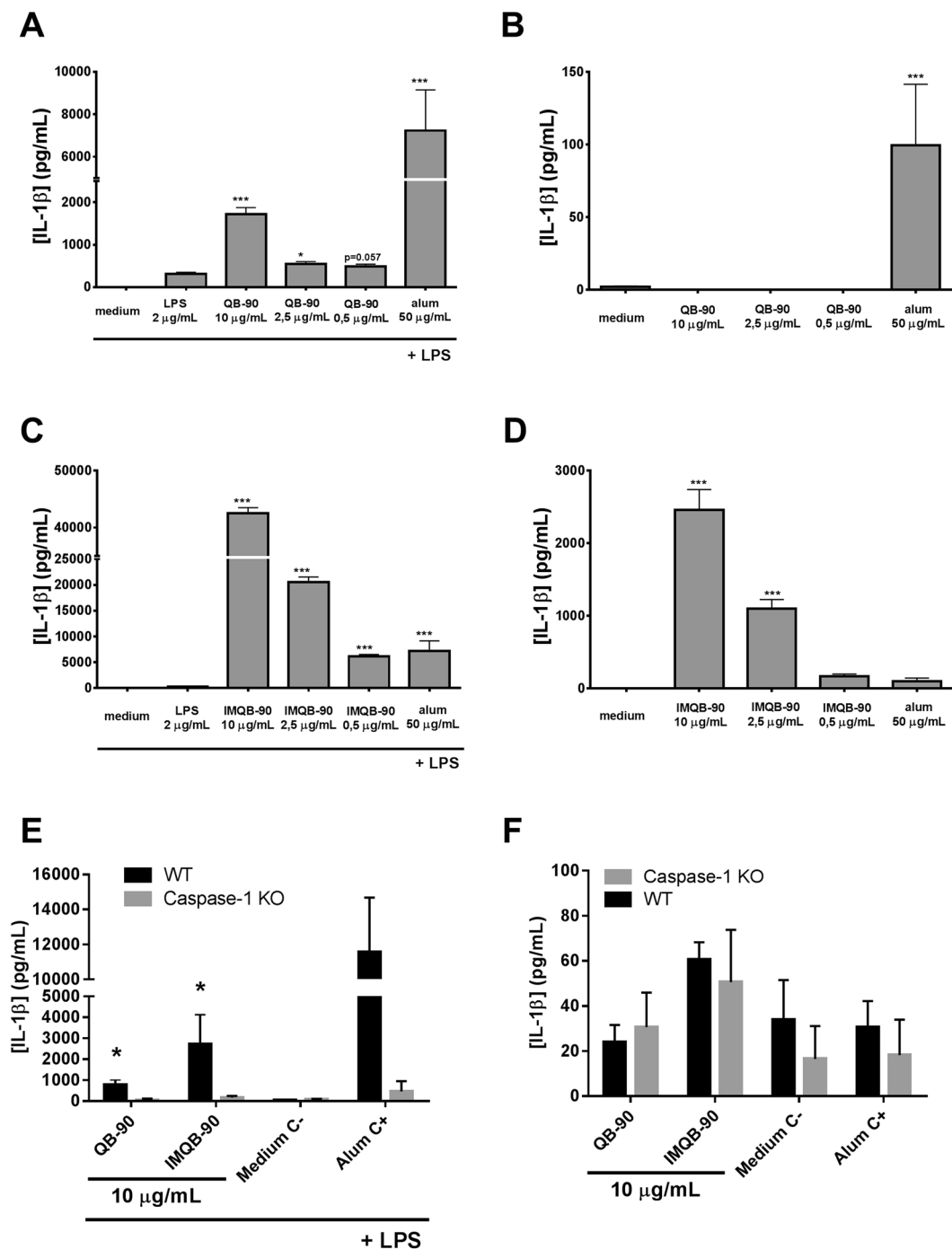


Figure 6. Induction of IL-1 β secretion by QB-90 and IMQB-90 in murine BMDCs. WT C57Bl/6 mice BMDCs (A–D) were primed for two hours with (A,C) or without (B,D) 10 μ g/mL of LPS, and then stimulated during three hours with 10, 2.5 γ 0.5 μ g/mL of either QB-90 (A,B) or IMXQB-90 (C,D). WT and caspase-1/11 KO C57Bl/6 mice BMDCs were primed with (E) or without (F) LPS (10 μ g/mL), and then stimulated with 10 μ g/mL of either QB-90 or IMXQB-90. In all cases, cells were stimulated with cell culture media or aluminum hydroxide (alum 50 μ g/mL) as negative and positive controls, respectively. IL-1 β was measured in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as mean of triplicates $\pm$ SEM and are representative of two or more independent experiments. (* p < 0.05), and (***) p < 0.001 indicate significant differences detected between negative control and adjuvant stimulated cells determined by student's T- test.

waves of vaccine antigen presentation (direct trafficking of adjuvant and via peripheral APC-transport), which result in prolonged antigen presentation^{31,35}.

Regarding splenic and dLN neutrophils, QB-90 is able to induce a transient increase 24 hpi, which rapidly decrease and was no longer detectable at 48 hpi. However, IMXQB-90 formulation was able to keep the increase

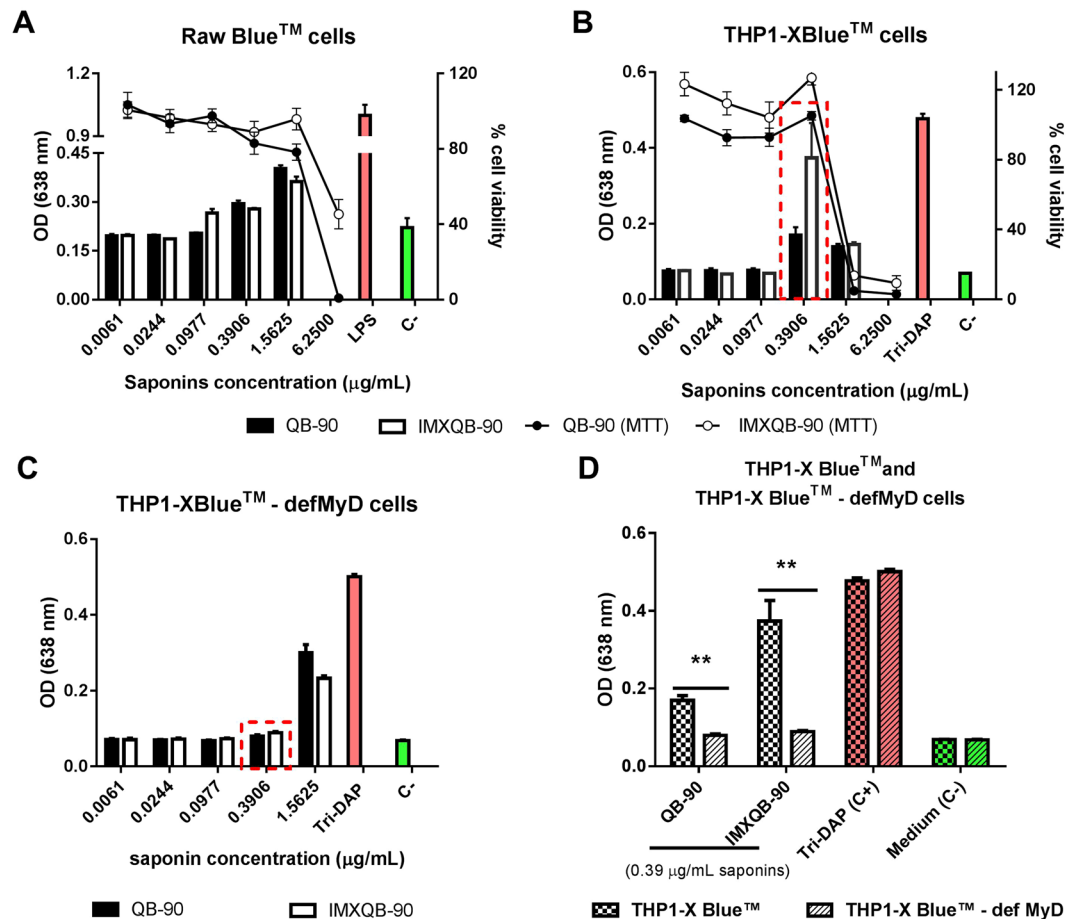


Figure 7. Reporter cell lines stimulated with QB-90 or IMXQB-90. Raw Blue™ (A), THP-1XBlue™ (B) and THP1-XBlue™-defMyD (C) reporter cell lines were stimulated overnight with either QB-90 or IMXQB-90 (containing 1.56, 0.39, 0.098, 0.024 or 0.006 µg of saponin per mL). Bars show expression of reporter gene (SEAP), quantified by optical density (OD) at 638 nm. The cell viability percentage, determined by MTT assay, is shown in lines and indicated in the right Y axis for Raw Blue™ cells (A) and for THP-1 Blue™ (B). In (D) a comparison of reporter-gene expression between THP-1 Blue™ and THP1-XBlue™-defMyD at 0.39 µg/mL of saponins was performed. Cells were primed with LPS (1 µg/mL, Sigma) or Tri-DAP (10 µg/mL, InvivoGen®) as a positive control for Raw Blue™ and both THP-1 cell lines, respectively. In B and C, data were analyzed by One-way ANOVA and Dunnet's post test, comparing groups against the negative control (C⁻). In (D) data were analyzed by One-way ANOVA and t-test. Differences were considered statistically significant when P value < 0.05 (**P < 0.01).

in neutrophils population until, at least, 48 hpi. Although the role of neutrophils in adjuvant activity is not completely clear, this cellular population may play an important role as a vehicle for transporting antigens into the dLN, in order to further influence the activation of different leukocytes, including NK-, B-cells, and DCs^{45,46}. At the injection site, neutrophils attract other immune cells by producing increased amounts of chemokines and transport antigens to the dLN^{31,47}.

Furthermore, our results show that QB-90 and IMXQB-90 are also able to recruit B and T cells (both CD4⁺ and CD8⁺). Taken together, our results are in good agreement with previous reports that showed that nanoparticulate formulations based in *Q. saponaria* saponins increase the number of DCs, NK-, B-, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, and granulocytes in the dLN within 6 h after inoculation, exhibiting a peak 24–48 hpi^{4,30,35,44}. Additionally, it has been shown that the cellular influx is transient and reversible, returning to normal levels by 72 hours^{35,37}. Regarding NK cells, we show herein that QB-90 and IMXQB-90 promote an increase in this cell population recruitment, in both spleen and dLNs. Interestingly, NK cells are a major source of IFN-γ during early immune responses and are known to enhance antigen-specific T cell responses⁴⁸. In this sense, we detected similar levels of IFN-γ in sera from mice previously sensitized for 24 h with QB-90 or IMXQB-90. However, TNF-α was detected only in mice treated with QB-90, suggesting that IMXQB-90 induces a more controlled inflammatory environment than QB-90.

As mentioned before, our results show a significant increase in DCs recruitment in spleen as well as dLN. In this sense, it has been reported that QuilA®-as well as particulate adjuvants-dramatically enhance IL-1β secretion by DCs^{3,5}. Our results show that QB-90-stimulated BMDCs secrete IL-1β in the presence of a TLR agonist

such as LPS. Interestingly, BMDCs stimulated solely with IMXQB-90 - without the need of LPS - promote the secretion of IL-1 β , and when primed with LPS, IL-1 β production is higher than that observed with alum stimulation (a well-known inflammasome activator). In addition, IL-1 β secretion observed in IMXQB-90-stimulated DCs is carried out in a caspase-1/11 dependent manner. These results suggest that the canonical-inflammasome pathway is being activated by this adjuvant formulation. When the interaction with innate immunity cellular receptors was assessed *in vitro*, our findings revealed that *Q. brasiliensis* saponins, as well as its nanoparticles, interact with macrophages or monocytes in a TLR-independent but in a MyD88-dependent manner. In summary, we suggest that both formulations from *Q. brasiliensis* saponins may activate canonical inflammasome pathways, as previously shown for other particulate adjuvants^{5,49} and specifically for ISCOMATRIXTM³⁶. Additionally, the adjuvant effects of QB-90 and IMXQB-90 might depend on the interaction of Caspase-1/11 and MyD88 pathways, consistent with previous reports on saponins from *Q. saponaria*^{3,4,36}, which have shown to activate innate immunity in a TLR-independent manner and have demonstrated *in vivo* that *Q. saponaria* nanoparticles did interact with the adaptor molecule MyD88⁴⁴. Considering these previous reports and our results obtained herein, it can be suggested that MyD88 adaptor molecule is involved in the mechanism of action of *Q. brasiliensis* leaf-derived saponins. In fact, it has been reported that ISCOMATRIXTM (formulated with commercially available saponins) induces lysosomal destabilization leading to IL-1 β release *in vitro* by APCs through NLRP3 inflammasome³⁶. Thus, it has been proposed that ISCOMATRIXTM nanoparticles migrate faster into the cytosol of multiple DCs subsets, promoting the induction of cytokines and chemokines, and bridge innate and adaptive immune responses *in vivo* in a Toll-like receptor-independent but MyD88-dependent manner⁴⁴. To the best of our knowledge, until now, only commercial saponins derived from *Q. saponaria* have been described to activate inflammasome pathways^{3,4,36,50}. It has been recently reported that soluble QS-21 delivery *in vitro* and *in vivo* induces inflammasome-mediated IL-1 β /IL-18 secretion in mice, but the exact mechanism is not clear yet^{2,3}. In addition, a novel mechanism of action has recently been proposed for saponins, based on inflammasome activation that enhances antigen cross-presentation by forming intracellular lipid bodies. In this mechanism, lipid bodies escape from endosomes and then translocate antigens for cross-presentation².

Finally, expression profiles of ninety-two immune related genes were assessed by qPCR24 hours after QB-90 and IMXQB-90 sensitization in dLNs. Our results show that some genes encoding for cytokines/chemokines and/or their receptors are differentially regulated by QB-90 or IMXQB-90. QB-90 treatment induces changes in the expression of 41 genes in comparison to control group, while IMXQB-90 alters the expression of 23 genes, being 19 genes in common. These results may suggest that inflammation induced by QB-90 is stronger than that induced by IMXQB-90. For example, QB-90 - unlike IMXQB-90 - induces the up-regulation of genes involved in cellular activation (*Cd28*, *Cd3e*, *Cd40*, and *Cd40lg*), co-stimulation (*Cd80*, *Cd86*, *Cd8a*) and transcription factors (*Stat3*, *Stat4*, *Tbx21*). On the other hand, IMXQB-90 do not activate as many pro-inflammatory and activation genes as QB-90, suggesting it may promote less intense and perhaps more controlled inflammatory responses than saponins alone. These findings are in line with results mentioned earlier regarding the cytokine profile elicited by both formulations, in which we found that QB-90 promoted a more proinflammatory environment. In addition, these results correlate with the characteristics of low toxicity and hemolytic activity of these ISCOMs-like formulations^{3,27,31,34}. Finally, both formulations yielded a change ≥ 10 -fold in expression of a set of immune-related genes (*Infjg*, *Gzmb*, *Ccl2*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il5* and *Il6*). Previous reports on early activation of innate cells by ISCOMs or ISCOMATRIXTM showed induction of an array of cytokines and chemokines in serum of vaccinated animals, including pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6), as well as chemokines and cytokines involved in macrophage and NK cell activation (CCL3, CCL2, MCP-1, IFN- γ), and/or neutrophil activation and migration (CXCL1, KC, CXCL10, IP-10, G-CSF)^{4,37,44}. Interestingly, studies performed with MF59 on human innate immune cells, such as DCs, monocytes, macrophages and granulocytes, showed induction of very similar immune-related genes^{51,52}.

Network analysis using the web-based network tool STRING indicates that nearly all differentially expressed genes in the context of QB-90 and IMXQB-90 inoculation are part of well-defined interaction networks. The STRING analysis reveals a strong link with pathways related to immune responses, response to microorganisms and positive regulation of cell proliferation. It is important to highlight that our study was focused only on specific genes, and may have missed possible targets for both formulations. In order to broaden the scope of this assessment, full transcriptome analysis experiments may be conducted to further characterize the transcriptional activity, and enable to create a global picture of the immunocompetent environment created by these promising adjuvants.

In summary, our results show that *Q. brasiliensis* saponin-based adjuvants induce an antigen-independent and transient immunocompetent environment. Early cellular responses are observed for both QB-90 and IMXQB-90, at local (dLN) and systemic (spleen) levels. Interestingly, IMXQB-90 elicits a less intense systemic pro-inflammatory response, whilst still being able to activate by itself - at least *in vitro* - the inflammasome through Caspase-1/11 and MyD88 pathways. Moreover, in terms of number of immune related genes, IMXQB-90 also seems to induce a less intense inflammation in the dLN. Nonetheless, when the adaptive immune response was assessed, our previous reports show that both formulations induced similar Th1/Th2 immune profiles, but the nanoparticulate formulation displayed a stronger immune response than the soluble saponin fraction³⁴.

Overall, our results reinforce the postulation of using leaf-extracted *Q. brasiliensis* saponins and in particular their nanoparticles as potent vaccine adjuvants. We have demonstrated here that they are capable of promoting early immune responses that, considering our previous data, correlate with adequate adaptive immune responses^{18,20–23,34}. In addition, *Q. brasiliensis* leaves constitute a sustainable and readily renewable alternative source of saponins in relation to *Q. saponaria* barks. Last but not least, the results obtained here are particularly relevant, as they contribute to confirm that the mechanism of action of these new adjuvants is similar to that described for commercially available saponins. Thus, these results imply that these novel vaccine formulations may be used to attend uncovered medical needs for animal and human health.

Materials and Methods

Ethics statement. Animal manipulation was performed in accordance with “Comisión Honoraria de Experimentación Animal” (CHEA) guidelines and was approved by the Uruguayan University Research Ethics Committee (approval number 070153-000531-13) and Ethics Commission on Animal Experimentation (CEUA) in the “Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor”. Animals were appropriately housed with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity in a 12/12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*. All experiments were performed in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series - No. 170 revised 2005) and the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Saponin-derived adjuvants. Leaves from adult plants of *Q. brasiliensis* (A. St.-Hil. et Tul) Mart. were collected in Canguçu, RS, Brazil ($31^\circ 23' 42''$ S– $52^\circ 40' 32''$ W) (voucher ICN 142953, deposited at the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul). Extraction and purification of saponins were carried out as previously described¹⁷. IMXQB-90 nanoparticles were prepared by the modified ethanol injection technique^{34,53}. Visualization of the nanoparticles was performed by transmission electron microscopy (TEM) (Supplementary Figure).

Viral antigen preparation and mice immunization. The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolate EVI 001/94 was multiplied in Madin Darby Bovine Kidney cells (MDBK; originally ATCC CCL-22) as described elsewhere^{20,24}. The infectious titre of the virus suspension prior to inactivation was $10^{7.5}$ tissue culture infectious doses per mL. The inactivated virus suspension (referred to as BVDV onwards) was used as antigen for adjuvant testing for all assays.

Conventional female Rockefeller mice ($n = 5$) of the CF-1 breed (5–6 weeks old) were purchased from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre, RS, Brazil). Mice were subcutaneously inoculated (100 μL) in the hind limb twice with a two week interval with either BVDV antigen alone or with adjuvant QB-90 (50 μg). Injections were applied either in the same or opposite member sites, performed simultaneously, or saponin adjuvant was injected 24 or 48 hours prior or post antigen injection. Additionally, at zero hour, the animals were inoculated with formulated (adjuvanted vaccine) or unformulated (two shots; one for antigen and after 5 minutes, one for adjuvant). Mice were bled prior to inoculations (on day 0) and 2 weeks after the second immunization (day 28); sera were kept frozen (at -20°C) until processed.

Immunoassays for antibodies and delayed type hypersensitivity (DTH). Total anti-BVDV IgG1 and IgG2a were determined for each serum samples by ELISA, carried out essentially as previously described^{20,24} using as antigen the BVDV suspension used for mouse immunization. Antibody titres were expressed in OD_{492} nm. Sera were appropriately diluted in PBS-T (1:300 for IgG1 and 1:100 for IgG2a).

The DTH responses were evaluated in immunized mice on day 28 post first immunization. The BVDV-specific response of each animal was calculated based on values of injected footpad minus the average of the basal swelling^{21,24,34}.

Cell isolation from spleen, draining lymph nodes (dLNs) and flow cytometry analysis. BALB/c mice (8–12 weeks old) were purchased from DILAVE (MGAP-Uruguay) and kept at the Instituto de Higiene (UdelaR). Mice were injected subcutaneously (s.c.) ($n = 15$) at the base of the tail with 25 μL of QB-90 (10 μg) or IMXQB-90 (2.5 μg). The concentration of IMXQB-90 used in this study is defined as the saponin concentration within the particles. Control mice received 25 μL of saline. Spleen and inguinal draining lymph nodes (dLNs) were collected 24 and 48 h post inoculation (p.i.) ($n = 5$). Five animals were used for gene expression studies. From these, dLNs were collected 24 h post adjuvant administration and kept in RNeasy lysis solution (Qiagen) at -80°C .

Spleen and dLNs were collected in cold PBS and processed by mechanical disaggregation and then filtered through a 100 μm cell strainer (BD Falcon). Cells from the two symmetric dLNs of each mouse were pooled. Splenocytes were incubated in red blood cell lysis buffer, washed with PBS containing 2% FBS and passed through a 100 μm cell strainer. Cells were suspended in FACS buffer (PBS, pH 7.4, 0.5% BSA, 2 mM EDTA and 0.1% sodium azide) and counted with aid of a cell counter (Countess[®] Automated Cell Counter, Life Technologies[™]).

For flow cytometry analysis, cells were incubated 20 min at 4°C with rat serum (10% in FACS buffer) and then transferred to a 96-well microtiter plate and incubated with antibodies for 30 min at 4°C (5×10^5 cells, 100 μL /well). Antibodies used were anti-mouse CD3:PE (145-2C11), CD4:APC-Cy7 (RM4-5), CD8:PerCP (53-6.7), CD19:FITC (DX5), CD49:FITC (H1.2F3), MHC-II:FITC (I-A/I-E, 2G9), Gr-1:PE-Cy7 (RB6-8C5), CD11c:APC. All staining procedures were conducted on ice and reagents were purchased from Life Technologies. Cell populations were analyzed using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Retrieved data was analyzed using the FlowJo 7.6.2 software (LLC).

Cytokine quantification by Cytometric Bead Array (CBA). Mice were bled 24 and 48 h after sensitized with adjuvant formulation (QB-90 or IMXQB-90) and sera were kept frozen at -80°C until processed. Cytokines were measured by flow cytometry with aid of the mouse Cytometric Bead Array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). Standard curves for each cytokine were plotted and the concentration of each test sample in picograms per milliliter (pg/mL) was calculated using the FCAP software array v1.0.2 (BD Biosciences).

Murine bone-marrow-derived dendritic cells (BMDC) production and stimulation. C57BL/6 and C57BL/6 Caspase-1/11-deficient mice were purchased from Institut Pasteur de Montevideo. BMDCs were generated by differentiation of bone marrow precursors from 8- to 10-week-old C57BL/6 and KO mice for 10 days in

the presence of 20 ng/mL recombinant mouse GM-CSF (PeproTech) as described elsewhere⁵⁴. The cells obtained were between 85 and 95% CD11c⁺. On day 10, cells were plated at 0.4 million per well in 96-well plates and stimuli were added in medium containing 5 ng/mL GM-CSF. BMDC were primed with 10 ng/mL lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia coli* O127:B8, Sigma) for 2 hours and then stimulated with different doses (10, 2.5 and 0.5 µg/mL saponins concentration) of QB-90 or IMXQB-90. Alum (Alhydrogel, Sigma) was used as a control for inflammasome activation. After 3 hours, cell response was measured in terms of IL-1β production. Cell culture supernatants were assayed for IL-1β with ELISA kits from Biolegends according to the manufacturer's instructions. Cell viability was evaluated at the end of the assay by flow cytometry, using Topro-3 staining (Invitrogen).

Immunostimulation of pattern recognition receptors. To determine if QB-90 or IMXQB-90 were able to activate innate immunity receptors activation, Raw BlueTM (murine macrophages-derived) THP-1 BlueTM (human monocytes-derived) and THP-1 BlueTM-defMyD (human monocytes-derived lacking MyD88 gene) reporter cell-lines (InvivoGen) were stimulated with QB-90 or IMXQB-90. These commercial cell-lines used constitutively over express pattern recognition receptors (PRRs), and stably express an NF-κB and AP-1-inducible secrete embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene. Upon TLR stimulation this cells activate transcription factors and subsequently the secretion of SEAP, which is detectable by the addition of QUANTI-BlueTM.

Raw BlueTM (1×10^5 cells/mL), THP1-XBlueTM and THP1-XBlueTM-defMyD (1×10^6 cells/mL) were plated in 96-well cell-culture plates (Greiner) following manufacture's recommendations (InvivoGen®). Cells were stimulated with different concentrations of QB-90 or IMXQB-90 (6.250, 1.562, 0.390, 0.097, 0.0244, 0.006 µg/mL of saponins), and cultured overnight at 37 °C and 5% CO₂. Each sample was tested in triplicate. As positive control L-Ala-γ-D-Glu-mDAP (Tri-DAP 10 µg/mL, InvivoGen®) was used for THP-1 cells, and LPS (1 µg/mL, Sigma) for Raw BlueTM cells. In all cell lines Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate-saline buffer (PBS) was used as a negative control, and the ethanolic stock solution used for the IMXQB-90 formulation was included as vehicle control. After incubation, supernatants were measured using QUANTI-BlueTM in accordance with manufacturer's specifications. Plates containing supernatants and QUANTI-BlueTM were incubated during 3 hours at 37 °C and SEAP activity, representing activation of NF-κB/AP-1, was measured on a Tecan SunriseTM microplate reader (TECAN) using Magellan Data Acquisition & Analysis Software version 7.2®.

Cell cytotoxicity assay. Cytotoxicity was determined using the MTT assay. Briefly, reporter cell lines RawXBlueTM and THP1-XBlueTM (InvivoGen®) were seeded at a concentration of 4.0×10^4 per well on 96-well cell-culture plates (Greiner) and maintained at 37 °C under a humid atmosphere with 5% CO₂. After 18 h, the medium was removed and 100 µL of culture medium containing different concentrations of either QB-90 or IMXQB-90 (6.250, 1.562, 0.390, 0.097, 0.0244, 0.006 µg/mL of saponins) were added to each well. Six replicates of each sample were performed. Plates were incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. After incubation, 50 µL of 5 mg/mL of MTT (Sigma) were added to each well and the cells were incubated 4 hours. The plates were centrifuged ($1500 \times g$ for 5 min) and the supernatants containing untransformed MTT were carefully removed. 50 µL of 20% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma) were added to each well in order to solubilize the formazan crystals, and the OD₅₄₀ nm was measured in an ELISA reader (Tecan SunriseTM). Results were expressed as the percentage of viability, considering OD of untreated control cells as 100% of viability.

RNA isolation and immune-related gene expression. Changes in mouse immune-related gene expression in dLNs from mice inoculated with either QB-90 or IMXQB-90 preparations were detected using a TaqMan® Mouse Immune Array by qPCR with the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For these studies, RNA was isolated from dLNs at 24 h post adjuvant administration (or mock inoculated with saline solution). Each experimental sample represents two pooled dLN collected from mice (n = 5). Prior to RNA isolation, dLNs were homogenized in 1 mL of TRIzol (Ambion). RNA was further purified using Pure Link RNA mini Kit (Ambion). RNA integrity was checked on Bioanalyzer (Agilent) and quantified by fluorometry (Qubit, Invitrogen). cDNA was synthesized by High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Fold change was calculated using the Pfaffl method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) for dLN from QB-90 and IMXQB-90 and being compared with the mock group⁵⁵. The online software STRING (combined score >0.4) was carried on to perform protein interaction network analysis⁵⁶.

Statistical analysis. The significance of differences was assessed using nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Students T- test was used for evaluation BMDC experiment. GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, Inc.) was used for data analysis. Results are expressed as the mean or median value from individuals in each group ± SEM or box-and-whiskers. A p value equal or less than 0.05 was considered statistically significant.

References

- Petrovsky, N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Safety* **38**, 1059–1074 (2015).
- den Brok, M. H. *et al.* Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nature Communications* **7**, 13324 (2016).
- Marty-Roix, R. *et al.* Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 1123–1136 (2016).
- Detienne, S. *et al.* Central Role of CD169(+) Lymph Node Resident Macrophages in the Adjuvant activity of the QS-21 Component of AS01. *Scientific reports* **6**, 39475 (2016).
- Oleszycka, E. & Lavelle, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Current Opinion in Immunology* **28**, 1–5 (2014).
- Leroux-Roels, G. *et al.* Impact of adjuvants on CD4+ T cell and B cell responses to a protein antigen vaccine: Results from a phase II, randomized, multicenter trial. *Clinical Immunology* **169**, 16–27 (2016).

7. O'Hagan, D. T., Friedland, L. R., Hanon, E. & Didierlaurent, A. M. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Current Opinion in Immunology* **47**, 93–102 (2017).
8. Delany, I., Rappuoli, R. & De Gregorio, E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Molecular Medicine* **6**, 708–720 (2014).
9. Chauhan, N., Tiwari, S., Iype, T. & Jain, U. An overview of adjuvants utilized in prophylactic vaccine formulation as immunomodulators. *Expert Review of Vaccines* **16**, 491–502 (2017).
10. Sun, H. X., Xie, Y. & Ye, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27**, 1787–1796 (2009).
11. Sivakumar, S. M., Safhi, M. M., Kannadasan, M. & Sukumaran, N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharmaceutical Journal* **19**, 197–206 (2011).
12. Bonam, S. R., Partidos, C. D., Halmuthur, S. K. M. & Muller, S. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 771–793 (2017).
13. Bigaeva, E., Doorn, E., van, Liu, H. & Hak, E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *Plos One* **11**, e0154757 (2016).
14. Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O. & Gin, D. Y. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert review of vaccines* **10**, 463–70 (2011).
15. Buglione-Corbett, R. *et al.* Reduced MyD88 dependency of ISCOMATRIX™ adjuvant in a DNA prime-protein boost HIV vaccine. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **10**, 1078–1090 (2014).
16. Didierlaurent, A. M. *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert review of vaccines* **584**, 1–9 (2016).
17. Kauffmann, C. *et al.* Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural product research* **18**, 153–7 (2004).
18. Fleck, J. D. *et al.* Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* **24**, 7129–7134 (2006).
19. 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. *Phytochemistry Letters* **20**, 228–233 (2017).
20. Cibulski, S. *et al.* Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine* **36**, 55–65 (2017).
21. Silveira, 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* **29**, 9177–9182 (2011).
22. De Costa, F. *et al.* Alternative inactivated poliovirus vaccines adjuvanted with *Quillaja brasiliensis* or Quil-A saponins are equally effective in inducing specific immune responses. *PLoS ONE* **9**, 1–7 (2014).
23. Yendo, A. C. A. *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* **34**, 2305–2311 (2016).
24. Cibulski, S. P. *et al.* *Quillaja brasiliensis* saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **45**, 1–8 (2016).
25. O'Hagan, D. T. & Fox, C. B. New generation adjuvants – From empiricism to rational design. *Vaccine* **33S**, B14–B20 (2015).
26. de Groot, C. & Muller-Goymann, C. C. Saponin Interactions with Model Membrane Systems - Langmuir Monolayer Studies, Hemolysis and Formation of ISCOMs. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118387> (2016).
27. McKenzie, A., Watt, M. & Gittleson, C. ISCOMATRIX vaccines: Safety in human clinical studies. *Human vaccines* **6**, 237–246 (2010).
28. Morein, B., Sundquist, B., Höglund, S. & Dalsgaard, K. & Osterhaus, a. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* **308**, 457–460 (1984).
29. Maraskovsky, E. *et al.* Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology and cell biology* **87**, 371–6 (2009).
30. Sun, H. X., Xie, Y. & Ye, Y. P. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* **27**, 4388–4401 (2009).
31. Morelli, A. B. *et al.* ISCOMATRIX: A novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *Journal of Medical Microbiology* **61**, 935–943 (2012).
32. Drane, D. *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* **5**, 151–157 (2009).
33. Sun, H. X., Wang, H. & Xu, H. shun & Ni, Y. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine* **27**, 3984–3991 (2009).
34. Cibulski, S. P. *et al.* Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* **34**, 1162–1171 (2016).
35. Morelli, A. B. & Maraskovsky, E. In *Immunopotentiators In Modern Vaccines* (eds Schijns, V. E. J. C. & O'Hagan, D. T.) 311–332 (2016).
36. Wilson, N. S. *et al.* Inflammasome-Dependent and -Independent IL-18 Production Mediates Immunity to the ISCOMATRIX Adjuvant. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 3259–68 (2014).
37. Duewell, P. *et al.* ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells *in vivo* leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 55–63 (2011).
38. Reimer, J. M. *et al.* Matrix-M™ adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen. *PloS one* **7**, e41451 (2012).
39. Magnusson, S. E. *et al.* Immune enhancing properties of the novel Matrix-TM adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice. *Vaccine* **31**, 1725–1733 (2013).
40. Drane, D., Gittleson, C., Boyle, J. & Maraskovsky, E. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert review of vaccines* **6**, 761–72 (2007).
41. Mosca, F. *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10501–6 (2008).
42. Gupta, R. K., Varanelli, C. L., Griffin, P., Wallach, D. F. H. & Siber, G. R. Adjuvant properties of non-phospholipid liposomes (Novasomes®) in experimental animals for human vaccine antigens. *Vaccine* **14**, 219–225 (1996).
43. Ott, G. *et al.* MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccine. *Pharm Biotechnol* **6**, 277–296 (1995).
44. Wilson, N. S. *et al.* ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunology and Cell Biology* **90**, 540–552 (2012).
45. Schuster, S., Hurrell, B. & Tacchini-Cottier, F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *Journal of leukocyte biology* **94**, 671–5 (2013).
46. O'Hagan, D. T. *et al.* Del. The history of MF59 adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert review of vaccines* **12**, 13–30 (2013).
47. Calabro, S. *et al.* Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* **29**, 1812–1823 (2011).
48. Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**, 536–544 (2013).
49. Jo, E.-K., Kim, J. K., Shin, D.-M. & Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* **13**, 148–59 (2016).

50. Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P.-Y. & Re, F. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. *The Journal of Immunology* **181**, 17–21 (2008).
51. O'Hagan, D. T., Ott, G. S., De Gregorio, E. & Seubert, A. The mechanism of action of MF59 - An innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* **30**, 4341–4348 (2012).
52. Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D. T. & Wack, A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **180**, 5402–5412 (2008).
53. Lendemans, D. G., Myschik, J., Hook, S. & Rades, T. Immuno-stimulating complexes prepared by ethanol injection. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57**, 729–733 (2005).
54. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**, 77–92 (1999).
55. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45 (2001).
56. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research* **45**, D362–D368 (2017).

Acknowledgements

The present investigation was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) project grant code number FMV_2014_1_104823 and postgraduate fellowship to MRP (fellowship code POS_FMV_2015_1_1005280). This work was supported also by the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Uruguay), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) (Grant No. 303432/2015-2) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP Brazil) proj. SANIMARS (No. 01.10.0783.04). P.M.R. and A.G.F.N. are the recipients of CNPq research productivity fellowships, levels 1A and 1B, respectively. F.S. is a recipient of ANII research productivity fellowship, level 1.

Author Contributions

S.P.C., and F.S., designed and performed most of experiments, analyzed data and wrote the paper; M.R.P., M.M., C.C., contributed to some experimental conception and design. A.C.A.Y. and A.G.F.N. isolated and purified the QB-90 saponin fraction. S.P.C., M.R.P., M.M., C.C., G.M.E. and F.S., analyzed and/or interpreted the data. S.P.C., M.R.P., G.M.E., P.M.R. and F.S., wrote the manuscript. All authors were involved in critically revising the manuscript for important intellectual content.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31995-1>.

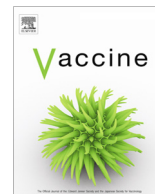
Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines

Samuel Cibulski^{a,b,1}, Mariana Rivera-Patron^{c,1}, Norma Suárez^c, Macarena Pirez^d, Silvina Rossi^e, Anna Carolina Yendo^{f,g}, Fernanda de Costa^{f,g}, Grace Gosmann^g, Arthur Fett-Neto^f, Paulo Michel Roehs^b, Fernando Silveira^{c,*}

^a Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República (Udelar), Av. Alfredo Navarro 3051, CP 11600 Montevideo, Uruguay

^d Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Udelar, Av. Alfredo Navarro 3051, Montevideo CP. 11600, Uruguay

^e Departamento de Bioquímica Clínica, Instituto Polo Tecnológico, Facultad de Química, Udelar, Ramal "José D'Elia" Ruta 101 y 8, CP. 91000 Canelones, Uruguay

^f Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Biotecnologia e Departamento de Botânica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2017

Received in revised form 24 October 2017

Accepted 13 November 2017

Available online 23 November 2017

Keywords:

Adjuvants

Saponins

Quillaja brasiliensis

BVDV

Dose-sparing

Humoral and cellular responses

ABSTRACT

Saponin-based adjuvants are promising adjuvants that enhance both humoral and T-cell-mediated immunity. One of the most used natural products as vaccine adjuvants are *Quillaja saponaria* bark saponins and its fraction named Quil A[®]. Despite that, its use has been restricted for human use due to safety issues. As an alternative, our group has been studying the congener species *Quillaja brasiliensis* saponins and its performance as vaccine adjuvants, which have shown to trigger humoral and cellular immune responses comparable to Quil A[®] but with milder side effects. Here, we studied a semi purified aqueous extract (AE) and a previously little characterized saponin-enriched fraction (QB-80) from *Q. brasiliensis* as vaccine adjuvants and an inactivated virus (bovine viral diarrhea virus, BVDV) antigen co-formulated in experimental vaccines in mice model. For the first time, we show the spectra pattern of the *Q. brasiliensis* saponins by MALDI-TOF, a novel and cost-effective method that could be used to characterize different batches during saponins production. Both AE and QB-80 exhibited noteworthy chemical similarities to Quil A[®]. In addition, the haemolytic activity and toxicity were assessed, showing that both AE and QB-80 were less toxic than Quil A[®]. When subcutaneously inoculated in mice, both fractions promoted long-term strong antibody responses encompassing specific IgG1 and IgG2a, enhanced the avidity of IgG antibodies, induced a robust DTH reaction and significantly increased IFN- γ production in T CD4⁺ and T CD8⁺ cells. Furthermore, we have proven herein that AE has the potential to promote dose-sparing, substantially reducing the dose of antigen required for the BVDV vaccines and still eliciting a mixed Th1/Th2 strong immune response. Based on these results, and considering that AE is a raw extract, easier and cheaper to produce than commercially available saponins, this product can be considered as candidate to be escalated from experimental to industrial uses.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a major pathogen responsible for diseases in ruminants worldwide – especially in dairy and

beef cattle populations – that leads to significant economic losses. Although the name of the virus refers to a specific disease, BVDV is a pathogen that affects multiple organs in many ruminant species. The heaviest burden of BVDV infections is displayed through reproductive losses, as infections of pregnant cows may give rise to abortions, foetal malformations, and persistently infected (PI) calves, being the latter a major strategy for virus perpetuation and dissemination of the infection in herds [1]. PI calves are often

* Corresponding author.

E-mail address: fsilveira@higiene.edu.uy (F. Silveira).

¹ These authors contributed equally to this work.

weak at birth but may be phenotypically normal and are important to the epidemiologic aspects of viral propagation as they constitute a biological reservoir [2].

BVDV is an enveloped, single-stranded RNA virus, and is the prototypic member of the *Pestivirus* genus within the family *Flaviviridae* [3]. There are two species of BVDV [4,5]. BVDV1 includes the classical BVDV isolates, which are commonly used as laboratory reference, and is subdivided into types 1a and 1b [6]. BVDV2 comprises the BVDV strains associated with high mortality, acute and peracute infections [7]. Vaccination is widely used to control manifestations of BVDV infections. Yet, such control still may be improved by rational vaccine design [8]. Modified live virus (MLV) and inactivated or killed virus (KV) BVDV vaccines for cattle have been available for more than 50 years. In attempting to overcome BVDV's antigenic diversity, MLV and KV vaccines nowadays are often designed to include both BVDV1 and BVDV2 antigens [7]. In addition, different adjuvants such as alum, saponins, or combination of these have been added to vaccine preparations in order to enhance immune responses [9]. Vaccine adjuvants have been used in order to induce a faster and stronger immune response that correlates with increased protection or allow dose-sparing, very useful in the case of expensive or difficult-to-produce antigens, affording a decrease in the manufacturing cost of vaccines [10,11]. Among these, the most widely used adjuvants approved for human and veterinary vaccines (mainly parenteral injections) are alum compounds [12], which primarily stimulate the production of antibodies. However, in some infections, particularly those caused by intracellular pathogens such as BVDV, antibodies are not sufficient to induce protection [13,14]. In such cases, stimulation of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells is not only required but essential for eliciting protective responses [15].

In attempting to increase stimulation of cell mediated responses, many natural products have been targeted as potential adjuvants and are currently under investigation [16,17]. Among these, triterpenoid saponins extracted from *Quillaja saponaria* Molina, and in particular, a partially purified mixture of saponins, named Quil A[®] [18,19], is one of the most widely used saponin-based adjuvant for veterinary vaccines. Although it has shown to stimulate both humoral and cellular immune responses with the generation of T helper 1 (Th1) and cytotoxic cell (CTLs) responses [20,21], its use for human vaccines has been restricted due to safety issues such as local reactions, haemolytic activity and occasional events of systemic toxicity [18,22]. As an alternative, our group has been studying *Quillaja brasiliensis* saponins and their performance as vaccine adjuvants. *Q. brasiliensis* is the second of the two species recognized in the *Quillaja* genus, a native tree from southern Brazil and Uruguay. Saponin fractions obtained from *Q. brasiliensis* leaf extracts have proven to be highly immunogenic, yet inducing milder side effects than Quil A[®] [23]. Aqueous extracts (AE) and some purified fractions (named QB-90 and QB-80), have demonstrated to possess adjuvant potential similar to Quil A[®]. Both *Q. brasiliensis* saponins fractions and Quil A[®] showed similar patterns of antibody induction (IgG and its subclasses) and stimulation of cellular immunity biased towards Th1-associated responses [23–27]. Recently, the immune response elicited against BVDV antigen by formulations adjuvanted either with QB-90 or AE was reported [27]. In this previous study, we found that, the more purified fraction QB-90 was better in stimulating both cellular and humoral immune responses than AE, although the latter was also able to elicit a strong immune response. Nevertheless, AE is a saponin raw extract, and as such, is easier and cheaper to produce than the more purified saponin fractions [28].

Considering these encouraging results, in this study we analyze in more detail the long term adjuvant effect of AE in experimental BVDV vaccines. The purified *Q. brasiliensis* saponins fraction QB-80, which has been shown to elicit protective immunity when com-

bined with a rabies antigen [26], was evaluated in terms of its ability to induce an immune response in mice when included in experimental vaccines for BVDV. Prior to conducting these experiments, AE and QB-80 were partially characterized by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for the first time. We also examined the haemolytic activity of AE, and the *in vivo* toxicity of QB-80. Formulations containing BVDV antigen and *Q. brasiliensis* AE, or QB-80 as adjuvants, were compared to alum adjuvanted or unadjuvanted formulations, in terms of their ability to induce specific humoral and cellular immune responses. Finally, the dose-sparing effect of AE formulations was assessed.

2. Materials and methods

2.1. AE and QB-80 characterization by MALDI-TOF

AE and QB-80 were characterized by MALDI-TOF and compared to the commercially available saponins Quil A[®]. MALDI-TOF measurements were conducted on a Microflex LR MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) with a 337 nm nitrogen laser operated in positive ion lineal mode with delayed extraction and optimized in the *m/z* range of 0–20 kDa. Calibrations were performed with a peptide calibration standard mix (Bruker Daltonics). The laser was fired 100 times at each of ten locations for each sample well on a 96 well plate for a cumulative 1000 shots per sample well taken at 30% intensity. 1 µL of 1 mg/mL AE, QB-80 or Quil A[®] solutions were mixed with 1 µL of matrix solution (2,5-dihydroxybenzoic acid, 10 mg/mL in sterile H₂O with 1% TFA) at a 1:1 ratio. The sample and matrix mixes were spotted onto a 96 well stainless steel plate and allowed to air dry for 15 min at room temperature.

2.2. *In vitro* and *in vivo* toxicity assays

The haemolytic activity of saponins is one of the main indicators of cytotoxicity. In order to make a comparative evaluation of the haemolytic activities of AE, crude saponin fraction obtained from roots and rhizomes of *Gypsophila paniculata* (White Saponin, Merck[®]), *Q. saponaria* saponins (Acros Organics[™]), purified saponins fractions from *Q. brasiliensis* leaves extract (QB-90 and QB-80) and Quil A[®] (a purified fraction of saponins from barks of *Q. saponaria*, Brenntag) were tested over a range of concentrations (10–2000 µg/mL) for induction of haemolysis with 0.5% rabbit red blood cells (RBCs) as previously described [23]. Physiological saline solution and *Q. saponaria* saponins at 250 µg/mL were used as indicators of 0% and 100% haemolysis, respectively. Samples were tested in quadruplicate in V-bottom microtitre plates. The haemolytic activity was expressed as the end point dilution capable of inducing haemolysis in 50% of the RBCs (HD₅₀).

The acute toxicity of QB-80 was assessed in 8-weeks old CD1 male mice as previously described [29]. Briefly, mice (n = 5) were subcutaneously injected in the neck scruff with 100 µL of QB-80 or Quil A[®] solutions containing 150, 75, 37.5 or 18.75 µg of saponins per dose. The control group was injected with saline solution only. Mice were monitored for 72 h and signs of toxicity (lethality, local swelling, loss of hair, and piloerection) were assessed.

2.3. Vaccine adjuvants and antigen production

Q. brasiliensis (A. St.-Hil. et Tul.) Mart. leaves were collected from native adult plants naturally growing in the municipality of Canguçu, RS, Brazil (31°23'42"S–52°40'32"W). A voucher specimen is deposited at the UFRGS Herbarium (ICN 142953). AE were prepared from air-dried powdered leaves resuspended in distilled

water (1:10, w/v), filtered, partitioned with ethyl acetate and lyophilized. The residue was then submitted to further purification through reverse-phase chromatography to obtain fraction QB-80, as described previously [28,30]. Quil A[®] was purchased from Brenntag Biosector (Denmark). *Gypsophila paniculata* saponins were obtained from Merck[®] (Saponin Pure White, Merck[®]). Aluminium hydroxide (Alum) was obtained from Omega Produtos Químicos Ltda. (Brazil).

MDBK (Madin-Darby bovine kidney cells) were obtained from ATCC (originally CCL-22[™]) and cultured at 37 °C in a 5% CO₂ incubator in Eagle's minimal essential medium (E-MEM; Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum and antibiotics (penicillin 100 IU/mL; streptomycin 100 µg/mL). Cells were subcultured every 3–4 days following standard procedures. EVI001/94 BVDV strain was first characterized as BVDV1 using monoclonal antibodies. Then, this strain was confirmed as BVDV1 by 5' UTR sequencing, using primers described by Vilcek and colleagues [31]. For virus multiplication, an autochthonous cytopathogenic BVDV1 isolate (EVI001/94) was inoculated onto nearly confluent monolayers of MDBK cells at a multiplicity of infection of 0.01. When cytopathic effect was evident in about 90% of monolayers, cells and supernatants were harvested and frozen at –80 °C. Subsequently, the suspension containing the virus was thawed, clarified by low speed centrifugation (1500 g for 10 min) aliquoted and used as virus stocks. Infectious titres obtained were around 10^{8.3} 50% tissue culture infectious doses per mL (TCID₅₀) before inactivation with binary ethylenimine (BEI). The inactivated virus suspension was purified by sucrose density gradient centrifugation. The protein contained in the pellet obtained was quantified with the bicinchoninic acid (BCA) kit for protein determination (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit). The BVDV antigen suspension obtained was used for preparing vaccine formulations and contained approximately 33 µg of viral protein/mL.

2.4. Vaccination of mice

Female Swiss mice (6–7 weeks old) were purchased from the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre, Brazil). Prior to the beginning of the experiments, animals were acclimatized during one week under controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity, with a light–dark cycle of 12:12 h and fed with standard pelleted food and tap water *ad libitum*.

Experiment 1 (immunological assessment): mice were divided in groups of six individuals; groups were immunized subcutaneously on the hind neck as follows: 150 µL (5 µg) of BVDV antigen alone (without adjuvant) or either in the presence of 50 µL of AE, containing 400, 200 or 100 µg per dose (µg/ds); alum (100 µg/ds) or with 100, 50 or 10 µg/ds of the QB-80 fraction. The formulations of BVDV vaccines were prepared under aseptic conditions and kept at 4 °C until use. A booster injection was applied two weeks later (day 14). Blood samples were collected by *retro*-orbital bleeds at days 0, 14, 28 and 60 post-inoculation of the first dose of vaccine. Prior to bleedings, mice were anesthetized by exposure in an isoflurane chamber. Sera were stored at –20 °C until use.

Experiment 2 (antigen-sparing assessment): mice were immunized with 5.0, 1.0 or 0.5 µg of BVDV antigen in the presence of 400, 200 or 100 µg/ds of AE, as described previously. Bleedings were performed immediately before inoculations (days 0 and 14) and 2 weeks after the second immunization (day 28). Sera were stored at –20 °C until use.

All experiments were performed in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series – No. 170 revised 2005) and the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The project was approved by the Ethics Commission on Animal Experimentation

(CEUA) of FEPAGRO Animal Health, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF).

2.5. Immunoassays for antibodies

Anti-BVDV IgM, IgG (total), IgG1 and IgG2a titres were evaluated in each serum sample by indirect ELISA. Briefly, 96-wells ELISA plates (Nunc[™]) were coated during 18 h at 4 °C with 0.03 µg/well of BVDV antigen (the same used in the formulations of experiments 1 and 2) diluted in PBS (pH 7.2). After adsorption, plates were washed twice with 200 µL of PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T). After blocking with 180 µL of PBS-T with 5% skim milk during 1 h at 37 °C, the plates were washed twice with PBS-T. Serum samples were diluted in PBS-T (1:100 for IgM, 1:300 for IgG and IgG1; 1:100 for IgG2a) and added to plates in 100 µL volumes. After 1 h at 37 °C, plates were washed three times with PBS-T and incubated with adequate dilutions of peroxidase conjugated anti-mouse IgG, anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a peroxidase conjugates (Sigma) for 1 h at 37 °C. After another round of washings, 100 µL of OPD (ortho-phenylenediamine, Sigma) with 0.03% of H₂O₂ were added to each well. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the reaction was stopped by the addition of HCl 1 N (25 µL/well). Optical density was determined in a microplate reader at 492 nm. All samples were analyzed in duplicate. Data were expressed as the mean OD value of the samples minus the mean OD recorded in control wells.

Anti-BVDV IgG avidity was determined on mice sera by 3 M urea denaturation as described elsewhere [32]. Briefly, sera (diluted 1:100 in PBS-T with 5% skim milk) were added in quadruplicate to BVDV-coated ELISA plates (as described above). After 1 h incubation at 37 °C, plates were washed three times with PBS-T and 100 µL of 3 M urea were added to half of the wells. Wells that did not receive urea were filled with PBS-T. Plates were incubated for 30 min at 37 °C and washed three times with PBS-T. Subsequently, plates were incubated with anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma) for 1 h at 37 °C. Subsequent development procedures, stopping and readings were carried out as above. IgG avidity was expressed as avidity index (AI), calculated as follows: AI = (mean Abs of urea-treated wells/mean OD urea-untreated wells) × 100%.

2.6. Measurement of IFN-γ production in CD4⁺ and CD8⁺ cells

Spleens were collected under aseptic conditions, immersed in RPMI 1640 medium (Invitrogen) and mechanically dissociated to obtain a homogeneous cell suspension. Erythrocytes were lysed with ACK (Ammonium Chloride Potassium) lysis buffer. Subsequently, cells were pelleted by low speed centrifugation (380 g at 4 °C for 10 min), washed three times in fresh RPMI 1640 and resuspended in the same medium supplemented with 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM l-glutamine, and 10% foetal bovine serum. Cell counting by Trypan blue dye exclusion revealed >95% viability.

Splenocytes (1 × 10⁶ cells) were pulsed for 18 h with BVDV antigen (5 µg/mL). After 13 h of antigen pulse, the protein transport inhibitor brefeldin A was added to the medium (1 µL/mL, Golgi-Plug[™], BD Pharmingen). Following incubation, cells were washed twice in PBS supplemented with 2% FBS and stained with anti-CD4 or anti-CD8 conjugate (FITC conjugate, Molecular Probes). Subsequently, cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponins (S4521, Sigma). Fixed cells were then intracellularly stained with an anti-IFN-γ antibody (PE conjugate, Molecular Probes). Flow cytometry analyses were performed in a FACS Calibur (BD) cytometer and the results were analyzed with the FlowJo (Tree Star version 7.6.2) software. The percentage of antigen specific IFN-γ synthesis was calculated according to the

formula: (% of cells synthesizing IFN- γ after antigen stimulation)-(% of cells synthesizing IFN- γ after culture in medium only).

2.7. Statistical analysis

Experimental data regarding the induction of specific CD8⁺/IFN- γ ⁺ producing T-cells was analyzed by the Student's *t* test. All other experimental data were analyzed by one-way ANOVA test, Dunnett's post-test or Tukey's post-test for multiple comparisons, using GraphPad Prism version 7.00. Differences were considered statistically significant when $P \leq .05$.

3. Results and discussion

3.1. *Q. brasiliensis* AE and QB-80 saponins revealed molecular masses similar to the commercial *Q. saponaria* barks-extracted saponin fraction Quil A[®]

QB-80, AE and Quil A[®] were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 1). All three fractions revealed peaks which showed similar patterns among them in spectra regions of *m/z* 750–1000 and 1850–2200, which are characteristic of *Quillaja* saponins. The peaks detected in the low region of the spectra, around *m/z* 700 and 1000 are characterized as being base peaks of saponins formed by the cleavage of aglycone substituents [33]. Moreover, in the region between *m/z* 1850–2200 we found a pattern of peaks for *Q. brasiliensis* fractions which is in good agreement with previous studies conducted with *Q. saponaria* fractions by Nord and Kenne. In their studies, the presence of saponins with different trisaccharides moieties attached to quillaic acid aglycone was reported, as well as an acid chain linked to a fucose residue [34,35]. Based on the spectrum ions *m/z* 1898 and *m/z* 2029 shown in Fig. 1, which are present in all analyzed samples (A–C), as well as similar minor peaks between each spectra, it is possible to suggest close similarities between the saponins of these two species. Additionally, all three spectra contain product ions at high *m/z* values which are separated by 18, 42, 60 and 94 units. These patterns have been shown to be a specific feature of *Quillaja* saponins by previous studies of Kite and coworkers [33].

An increase in the ability to distinguish different peaks enrichment of saponins after purification of AE [28] was observed by the presence of additional peaks for QB-80 fraction in the region *m/z* 1600–2000 (Fig. 1C). Interestingly, some of them were also found by Nord and Kenne in *Q. saponaria* [33,34].

These results are particularly relevant since they contribute to elucidate the AE and QB-80 components. To our knowledge, there are few reports of MALDI-TOF analysis of *Q. saponaria* bark extract saponins fractions [34–36] and this is the first time a spectra pattern of AE and QB-80 of *Q. brasiliensis* leaf saponins is reported.

In addition the results presented here are in line with previous results reported by our group, regarding chemical similarities between Quil-A[®] and *Q. brasiliensis* fractions [37]. Recently, Wallace and colleagues reported a preliminary identification of 27 triterpenic saponins from the immunoadjuvant preparation named fraction B, obtained from *Q. brasiliensis* [38]. Taken together, these reports and our results contribute advance the chemical characterization of *Q. brasiliensis* bioactive saponin fractions.

Despite the fact that the full structure characterization of these plant metabolites is yet to be elucidated, the results obtained by MALDI-TOF analyses further support the close chemical similarities between saponins present in the two species of *Quillaja* [28]. MALDI TOF-MS analysis is a rapid and cost effective tool, which should be further explored as it may contribute to obtain standards and achieve reproducible protocols for extraction, purification and characterization of *Q. brasiliensis* saponins.

3.2. *Q. brasiliensis* saponins display less haemolytic activity in vitro and in vivo than commercially available saponins

Fig. 2A shows the haemolytic activity of the following saponins preparations: AE, *G. paniculata*, *Q. saponaria*, QB-90, QB-80 and Quil A[®]. The haemolytic activity was expressed in percentage considering 250 $\mu\text{g/mL}$ of *Q. saponaria* saponins and saline solution as 100 and 0% respectively.

AE of *Q. brasiliensis* showed an HD₅₀ of 822.3 $\mu\text{g/mL}$, the highest among all of the saponins tested, indicating that this is the least haemolytic of them. *Q. saponaria* and *G. paniculata* saponins had HD₅₀ values of 126.6 and 298.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The HD₅₀ value for QB-80 (55.0 $\mu\text{g/mL}$) was higher than that of Quil A[®] (35.9 $\mu\text{g/mL}$).

An *in vivo* assay was conducted to test the acute toxicity of QB-80. QB-80 inoculated mice remained healthy and showed no signs of local toxicity with any of the tested solutions (up to 150 $\mu\text{g/ds}$), until the end of the assay (72 h). However, animals inoculated with 150 and 75 μg of Quil A[®] showed high levels of lethality, reaching to 100 and 40% respectively at the end of the test (Fig. 2B). Animals injected with 37.5 or 18.75 $\mu\text{g/ds}$ did not show any toxicity signs (data not shown).

As mentioned previously, one of the critical issues in the use of saponins as vaccine adjuvants is the fact that they can raise safety concerns due to their toxic effects in the injection site [12,20]. The results obtained here showed that both fractions (AE and QB-80), were less toxic *in vitro* as revealed by the haemolysis assay than commercially available saponins assessed. Regarding the *in vivo* toxicity *Q. brasiliensis* QB-80 saponins also proved to be safer than Quil A[®]. AE acute toxicity was assessed *in vivo* and reported previously by our group. Mice injected subcutaneously with up to 400 $\mu\text{g/ds}$ of AE did not show any signs of toxicity (local swelling, hair loss, lethality) [30]. All these new results herein reported are consistent with data from our previous studies which confirmed that QB-90, as well as AE, were efficacious, safe and well tolerated in mice [23,24,27].

3.3. Subcutaneous administration of AE adjuvanted BVDV vaccines induces long term specific humoral and cellular immune responses in mice

The immune stimulating effect of subcutaneously injected formulations containing 5 $\mu\text{g/ds}$ of BVDV antigen and adjuvanted with AE in different concentrations (400, 200 and 100 $\mu\text{g/ds}$) or alum was studied in mice, and compared with the immune stimulating effect of unadjuvanted (BVDV).

Previously, we have reported the short-term (until day 28) immune response elicited by these formulations [27]. Here, anti-BVDV antibody titres were measured by ELISA, as previously described, 60 days after priming. Long-term high titres of antibodies induced for IgG (Fig. 3A) and IgG subclasses (Fig. 3B and C for IgG1 and IgG2a respectively) were only kept in AE formulations.

As previously reported by our group [27], only formulations with 400 and 200 $\mu\text{g/ds}$ of AE showed statistically significant differences in comparison with the unadjuvanted formulation, as the alum adjuvanted formulation did not show any differences. Furthermore, in animals inoculated with AE formulations, high titres of IgG1 and IgG2a isotypes were observed (Fig. 3B and C). Although not conclusive, this induced antibody isotype profile (IgG1/IgG2a) suggests that AE formulations were able to elicit a mixed Th1/Th2 balanced immune response. When comparing antibodies titres obtained at day 60 with those obtained at day 28 [27], once again only AE formulations (400 and 200 $\mu\text{g/ds}$) were able to keep significantly enhanced specific antibodies titres for all IgG isotypes. It is important to highlight that mice inoculated with the alum formulation were not able to induce a strong humoral

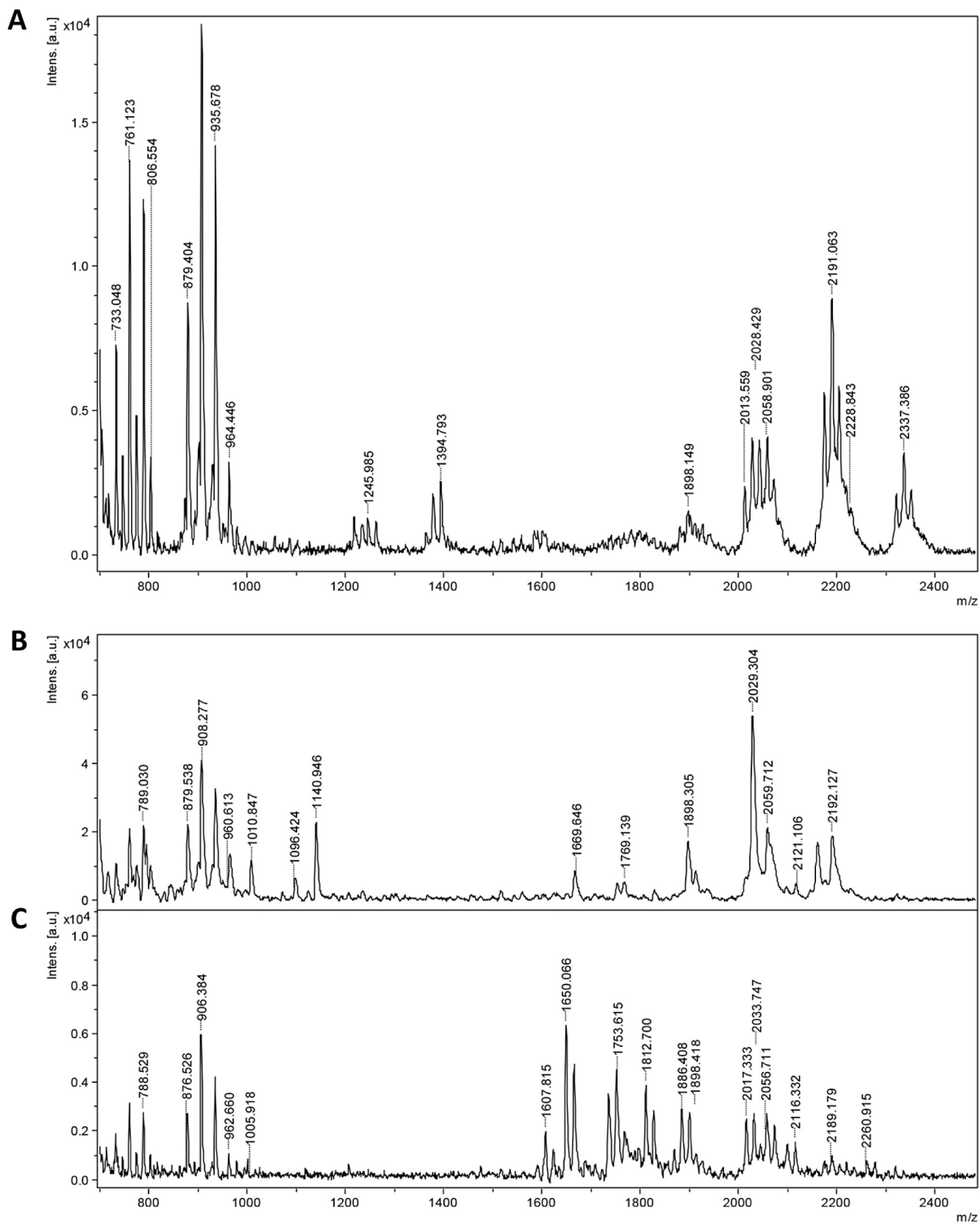


Fig. 1. MALDI-TOF mass spectrum. MALDI-TOF mass spectra of Quil A[®] (A), AE (B) and QB-80 (C) showed characteristic peaks of saponins between m/z 700 and 1000, and between m/z 1850 and 2200. The products were detected as $[M + Na]^+$ and/or $[M + K]^+$ ions.

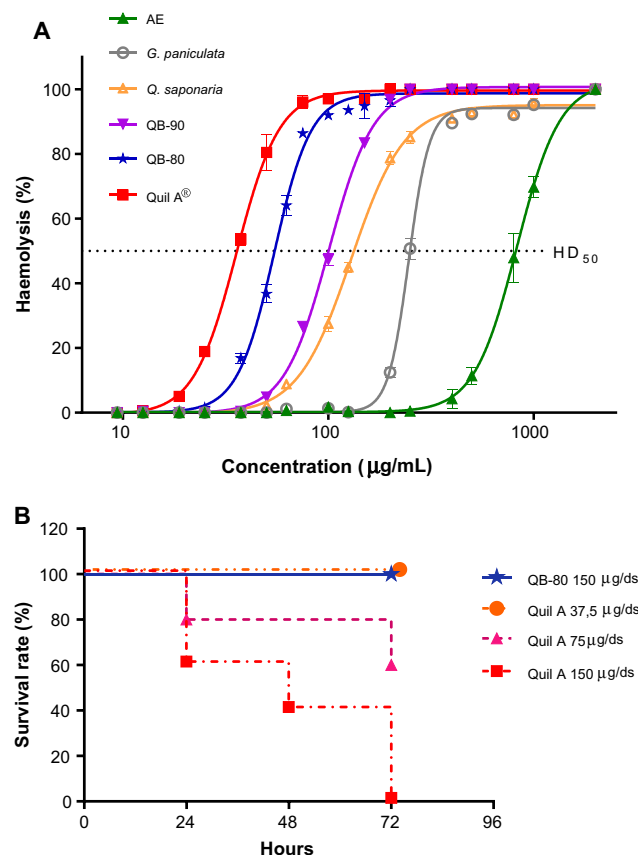


Fig. 2. Toxicity of saponins. (A) *In vitro* toxicity of saponins. Haemolytic activity of AE, *G. paniculata*, *Q. saponaria*, QB-90, QB-80 and Quil A®. Haemolytic activity is expressed as percentage of haemolysis referred to saline solution and *Q. saponaria* saponins (250 µg/mL), which were used as 0% and 100%, respectively. Results are presented as the mean value $\pm$ S.D. ($n = 4$). (B) *In vivo* QB-80 acute toxicity assay. Nine groups of CD1 male mice ($n = 5$) were injected with 100 µL of one of the following solutions: Quil A® or QB-80 (150.0; 75.0; 37.5; 18.75 µg) in saline solution, or saline solution alone as a negative control group. Animals were assessed daily during 72 h, regarding toxicity signs and lethality. Survival rates (in percentage) are shown throughout the assay.

immune response, as antibodies titres did not show statistically significant differences regarding the group inoculated with BVDV antigen only.

Isotype switch of antibodies is induced by different cytokines secreted by various cellular populations. In particular, IgG1 isotype switch is promoted by IL-4 secreted by Th2 cells, and thus, high antibody titres of this isotype are associated with a Th2-type immune response. The main Th1-effector cytokine in mice, IFN- γ , promotes switching to IgG2a; Th1-type responses are usually associated with enhanced production of antibodies of this isotype [39–41].

Taken together, data suggest that, when used as a vaccine adjuvant against a viral antigen, AE is able to elicit a long-term Th1/Th2 mixed immune response in mice. These results are consistent with our previous reports involving other *Q. brasiliensis* saponin fractions, when co-formulated with different viral antigens, such as bovine herpesvirus type 1 [30] and 5 [23], poliovirus [24], BVDV [27], and rabies virus [26].

3.4. Subcutaneous administration of AE adjuvanted experimental BVDV vaccine induces antigen-specific IFN- γ production in CD8⁺ T cells at long term (day 60)

In order to verify specifically the production of IFN- γ , splenocytes obtained from vaccinated mice at day 60 were stimulated

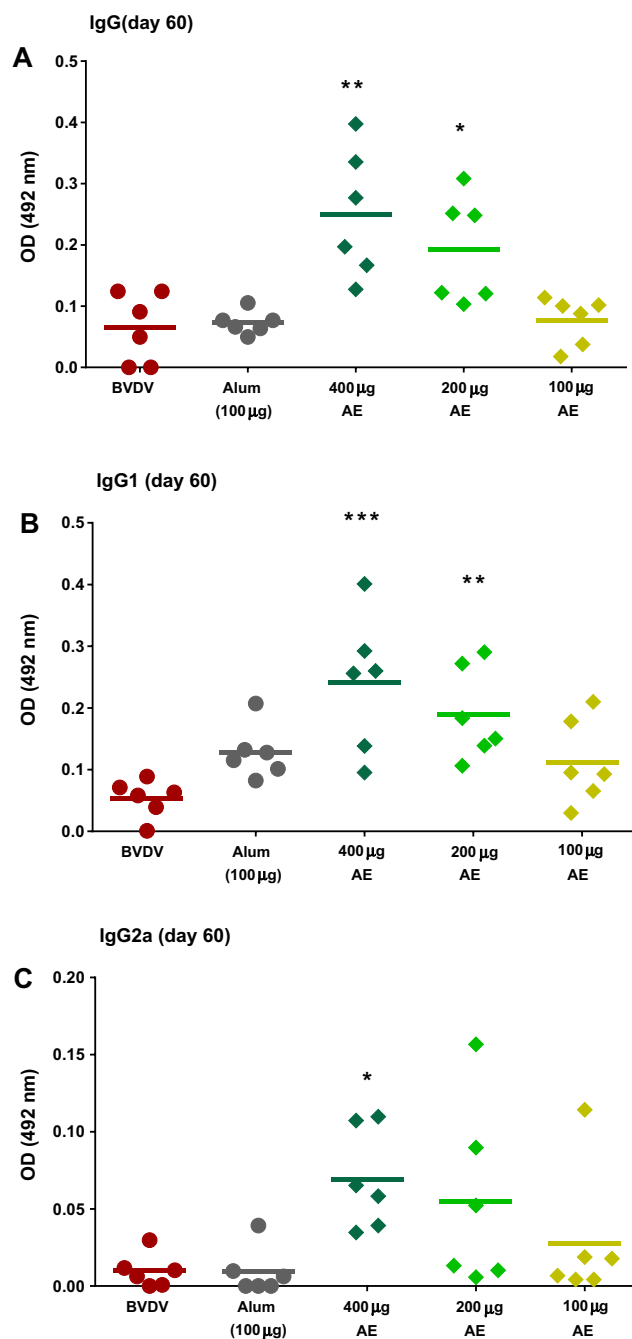


Fig. 3. AE adjuvanted formulations are able to induce long term specific humoral immune response against BVDV antigen. Immunizations were performed at day 0 (priming) and 14 (booster) either with no adjuvant (antigen only), formulated with AE (400, 200 or 100 µg/ds) or with Alum (100 µg/ds). Specific IgG (A), IgG1 (B) and IgG2a (C) antibody titres against BVDV antigen were measured in sera 60 days after priming. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and Dunnett's post-test. Statistically significant differences are indicated: * ($P \leq .05$), ** ($P \leq .01$) and *** ($P \leq .001$).

with BVDV antigen, subsequently surface-stained with anti-CD8 fluorescent dye-conjugated antibody and intracellularly stained with an anti-IFN- γ fluorescent dye-conjugated antibody, as previously described. Flow cytometry analysis showed that AE at 400 µg/ds was able to stimulate long term specific IFN- γ production by the CD8⁺ T lymphocytes, as evaluated 60 days after immunization, to higher levels than the formulation without adjuvant (Fig. 4).

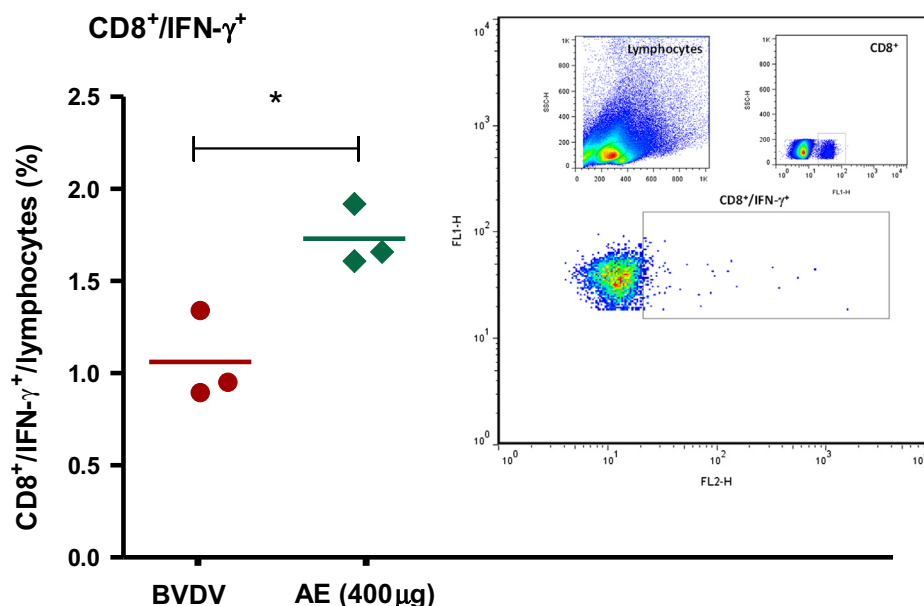


Fig. 4. AE induces antigen-specific IFN- γ production in CD8⁺ T cells. Mice were immunized with antigen (BVDV) or antigen plus AE (400 μ g/ds). Mice were euthanized 60 days after the first immunization. Splenocytes were re-stimulated with BVDV and production of IFN- γ by CD8⁺ T cells was assessed. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. Significant differences are indicated as * ($P \leq .05$) with the group immunized with no adjuvant.

As mentioned before, in mice, IFN- γ has been identified as the main Th1-effector cytokine. Eliciting a Th1-type immune response (in addition to Th2) is a great advantage of using AE as a vaccine adjuvant, as Th1 immune response is necessary to eliminate intracellular infections (such as viral ones and malaria) and cancer cells [20,21,42]. Despite that, currently available adjuvants lack the ability to induce efficient Th1 type immune responses [43,44]. Th1-dominant immune responses are generally associated with a controlled inflammation and tissue damage, mainly because of the action of another “Th1 cytokine”, TNF- β , in addition to IFN- γ . These cytokines recruit and activate inflammatory leukocytes, which become evident by the typical DTH reaction [39]. Regarding AE, DTH was assessed two weeks after booster, and, showed a robust response. When specific IFN- γ CD8⁺ T cells were assessed at day 28, a non significant IFN- γ production was detected [27]. However, when evaluated at long-term (day 60), AE induced the production of this Th1 type cytokine when stimulated with the BVDV antigen. In addition, some Th1 cells acquire cytolytic capacity, and cytokines produced by Th1 cells (mainly IL-2 and IFN- γ) promote differentiation of CD8⁺ T lymphocytes into active cytotoxic cells, and thus, being able to eliminate cancer or infected cells [39,42].

3.5. AE formulations provide dose-sparing of BVDV antigen

Previous experiments showed that AE adjuvanted formulations were able to elicit a stronger humoral response than alum formulations [27]. In view of this, the dose-sparing effect conferred by AE formulations was assessed. To achieve this goal, formulations containing different amounts of AE (400, 200 and 100 μ g/ds) and of BVDV antigen (5.0; 1.0 and 0.5 μ g/ds) were inoculated in mice, according to the vaccination protocol described previously. Two weeks after priming (Fig. 5A and B), and boosting (Fig. 5C–E), formulations with 400 and 200 μ g/ds and 5.0 and 1.0 μ g/ds revealed a significant increase in antibody titres (IgM, IgG and its isotypes) in relation to the non adjuvanted vaccine. There are no statistically significant differences among them, except for formulations containing 200 μ g/ds of AE, for which differences are found in IgG after priming (Fig. 5B) and for IgG2a after booster (Fig. 5E).

When the cellular immune response was assessed by the DTH assay (Fig. 5F), once again, formulations containing 5.0 or 1.0 μ g

of BVDV antigen per dose and 400 or 200 μ g of AE were able to prompt a DTH reaction, statistically different regarding to control group. Formulations which included 100 μ g/ds of AE were not able to elicit statistically different antibody titres when compared with unadjuvanted formulations (data not shown).

Hence, when used as a BVDV vaccine adjuvant, AE provides dose-sparing effect, allowing to formulate preparations decreasing 5-fold the amount of antigen needed per dose (from 5.0 to 1.0 μ g/ds), while still being able to trigger humoral and cellular immune responses, as required. Moreover, when comparing formulations with 5.0 versus 1.0 μ g/ds of BVDV, only formulations prepared with 200 μ g/ds of AE showed statistically significant differences in IgG and in IgG2a after priming and booster respectively. However, formulations prepared with higher amounts of AE (400 μ g/ds) did not show any differences in the humoral response between 5.0 and 1.0 μ g/ds of BVDV formulations. This supports the idea that AE would be the component responsible for promoting antibody isotype switching, as well as for generating a Th1-type immune response, in good agreement with what has been previously reported for other viral antigens [24,26,27,30]. Interestingly, this phenomenon is not observed in IgG1 antibody titres. As mentioned before, this is related to the fact that Quillajaceae saponin-based adjuvants, although promoting a mixed Th1/Th2 immune response, in general, tend to be biased towards Th1-type immune response [20,21,27,45].

Although further studies should be conducted, data suggest that *Q. brasiliensis* AE has emerged as a promising saponin-based vaccine adjuvant, as it presents two major advantages. AE is a saponin raw extract, and as such, is easier and cheaper to produce than more purified saponin fractions [28]. On the other hand, we have shown that it was able to confer dose-sparing effect when included in experimental vaccines against a viral antigen. These advantages are essential when a new adjuvant is considered as candidate to be escalated from experimental to industrial uses.

3.6. QB-80 promotes long term humoral and cellular immune responses in experimental BVDV vaccines in mice

The immune stimulating effect of QB-80 was assessed when included as adjuvant in BVDV experimental vaccines. As explained

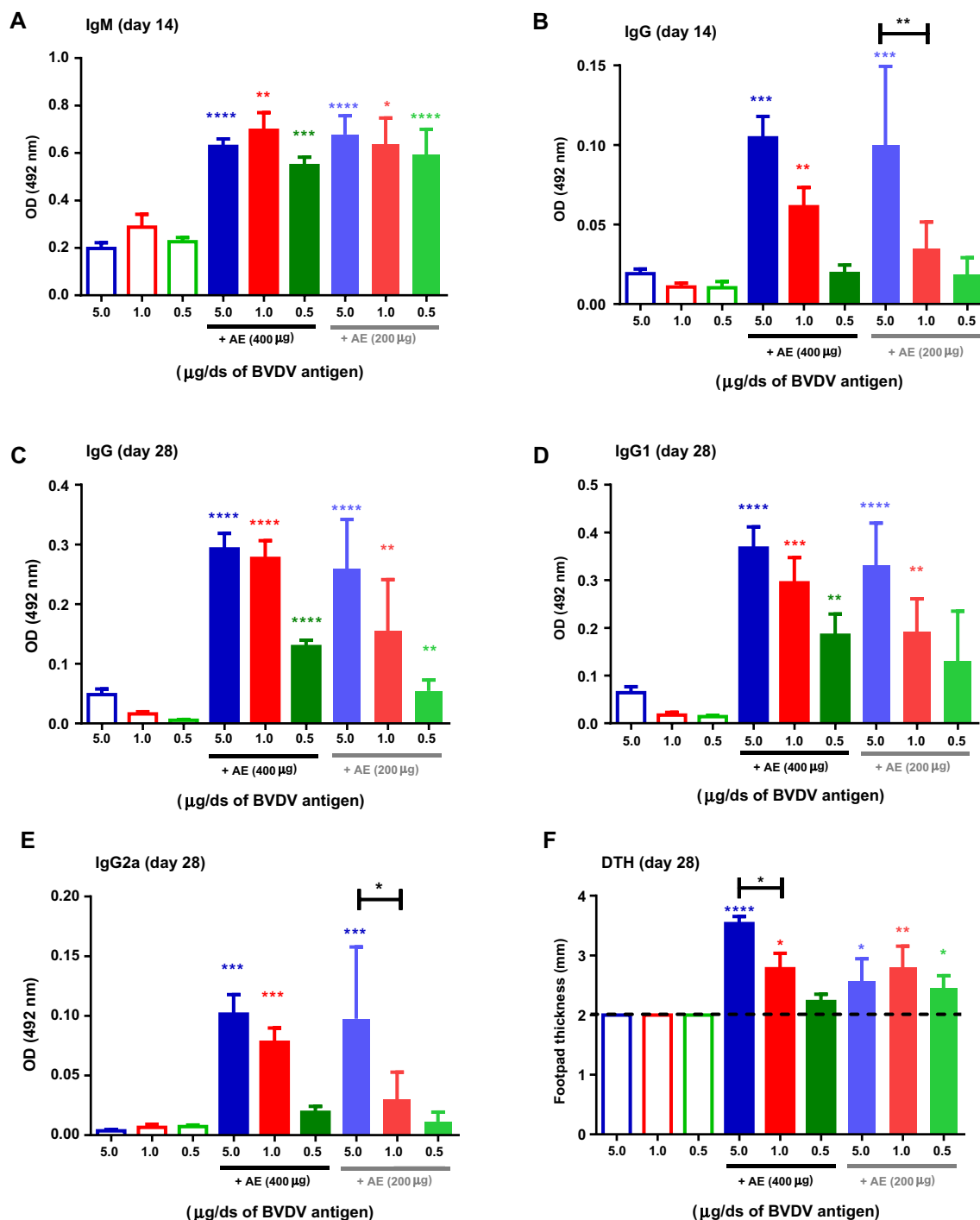


Fig. 5. AE provides BVDV antigen-sparing. The dose-sparing effect conferred by AE was assessed in mice immunized with formulations containing 5.0 (blue bars), 1.0 (red bars) and 0.5 (green bars) µg/ds of BVDV antigen alone (empty bars) or with either 400 (strong colored bars) or 200 (light colored bars) µg/ds of AE. Specific IgM (A) and IgG (B) were determined two weeks after priming. Two weeks after booster, IgG (C), IgG1 (D) and IgG2a (E) antibody titres were determined. The DTH reaction was assessed at day 28 (F) (dotted line indicates the basal footpad swelling thickness). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Dunnett's post-test, when compared to control group (empty bars for each amount of antigen), and statistically significant differences are showed by colored stars. The multi-comparison Tukey's post-test was applied to compare groups among each other (black stars). Statistically significant differences are indicated: * ($P \leq .05$), ** ($P \leq .01$), *** ($P \leq .001$), **** ($P \leq .0001$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

above, mice were vaccinated with either BVDV antigen alone (5 µg/ds) or with antigen plus QB-80 (100, 50 or 10 µg/ds) or alum as vaccine adjuvants, at day 0 and 14. Animals were kept until day 60. QB-80 formulations were able to significantly enhance specific IgM (Fig. 6A), IgG (Fig. 6B–D), IgG1 (Fig. 6E and F) and IgG2a (Fig. 6G and H) antibodies titres against BVDV antigen throughout the assay (day 28 and 60), whereas alum formulation was able to

increase only IgG1 specific antibodies titres at day 28 (Fig. 6E). In addition, when the avidity of IgG antibodies elicited by QB-80 formulations was assessed two weeks after booster (day 28), it proved to be significantly higher than the avidity of IgG antibodies elicited by the control group (unadjuvanted formulation), and more interestingly, than the alum adjuvanted formulation (Fig. 6I). Furthermore, the cellular immune response triggered by these

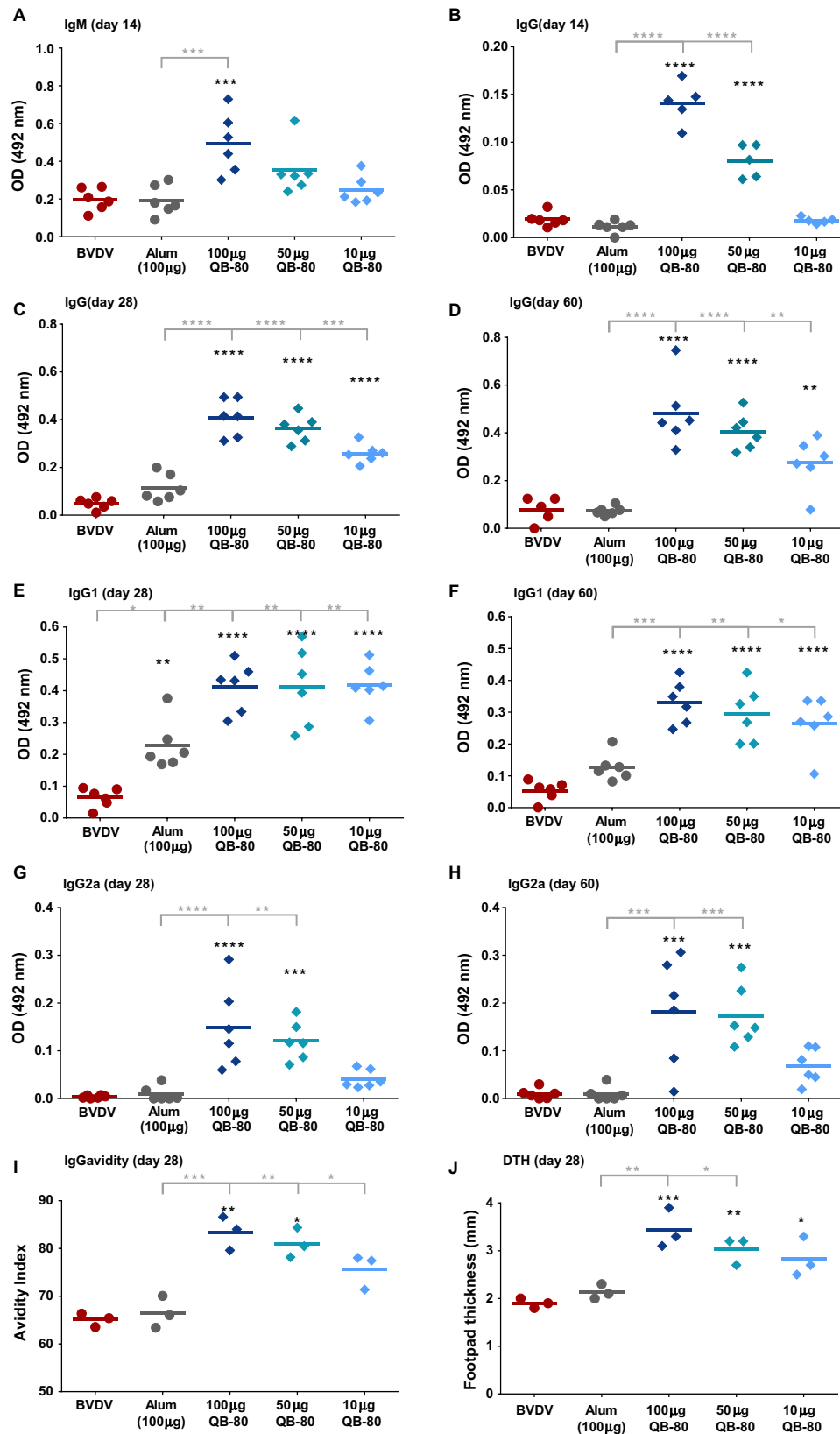


Fig. 6. QB-80 saponins fraction enhances specific anti-BVDV immune responses. Antibody titres of anti-BVDV IgM (A) and IgG (B) were measured in sera extracted 2 weeks after the first immunization (day 14). Two and six weeks after the second immunization (day 28 and 60) anti-BVDV IgG (C and D), IgG1 (E and F), and IgG2a (G and H) titres were determined. At day 28, the avidity index of anti-BVDV IgG antibodies was measured (I), and the DTH assay was performed (J). Mean value is indicated by line, and dots indicate individual values. Statistical analysis were performed in all cases (A–J) by one-way ANOVA and Dunnett's post-test to compare each group to control group (BVDV), and Tukey's post test to compare groups among each other. Significant differences are indicated: * ($P \leq .05$), ** ($P \leq .01$), *** ($P \leq .001$), **** ($P \leq .0001$), each group was compared to the group immunized only with BVDV antigen (black stars) and to alum group (grey stars).

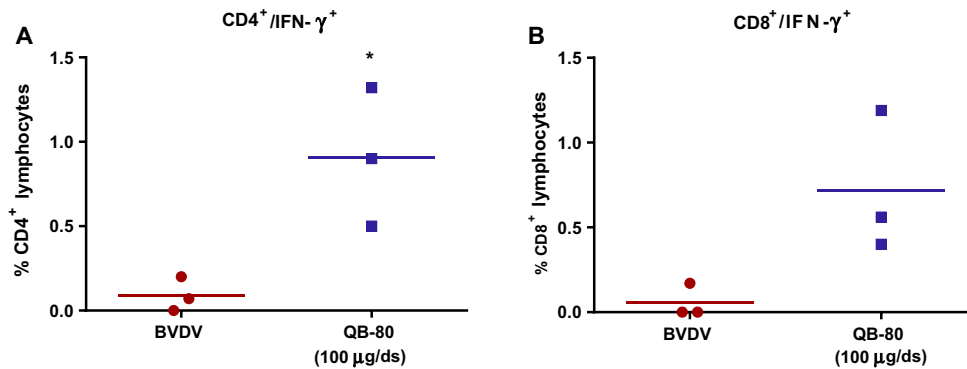


Fig. 7. QB-80 saponins induce antigen-specific IFN- γ production in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Mice were immunized with antigen only (BVDV) or antigen plus QB-80 saponins as adjuvant (100 μ g/ds). Mice were euthanized 28 days after the first immunization. Splenocytes were re-stimulated with BVDV and production of IFN- γ by CD4⁺ and CD8⁺ T cells was assessed. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. Significant differences are indicated as * ($P \leq .05$) with respect to the control group.

formulations was assessed by a DTH assay at day 28. As shown in Fig. 6J, alum adjuvanted formulation was not able to induce this kind of response, whereas QB-80 adjuvanted formulations elicited a significant enhanced cellular response in all cases (100, 50 and 10 μ g/ds), when compared to the unadjuvanted formulation.

The high levels of antibodies titres produced by QB-80 fraction formulations are in accordance with results reported previously when co-administering this fraction with a rabies viral antigen [26], and with the humoral immune response elicited by other *Q. brasiliensis* saponins fractions [23,24,27,30]. It is essential for adjuvants, not only generate a high titre, but to generate antibodies with high avidity [46]. This may correlate with a successful immune response, which allows the proper protection of the vaccinated individual, and the rapid clearance of a potential infection. Although the antibody avidity as a measure of adjuvant efficacy is rarely included when evaluating new compounds as adjuvants, this assessment adds valuable information that contributes to the proper understanding of mechanisms by which these components stimulate the immune system [47,48]. Herein we showed that antibodies elicited by the studied saponin fractions are of higher avidity than antibodies titres elicited by alum formulations, and based on this, we propose that the humoral immune response developed by *Q. brasiliensis* saponins may trigger a more adequate immune response.

The induction of positive DTH reaction is a great advantage of QB-80 fraction formulations. As DTH occurs due to the action of memory Th1-CD4⁺ T cells [49,50], results obtained here may imply that QB-80 fraction when used as a BVDV vaccine adjuvant, possibly promotes CD8⁺ T cells, yielding a Th1-type immune response. These results are also consistent with previous reports of our group [23,24,27–30].

To investigate IFN- γ production by T cells, we stimulated splenocytes obtained from vaccinated mice two weeks after booster (day 28) with BVDV antigen and the frequency of CD4⁺/IFN- γ ⁺ and CD8⁺/IFN- γ ⁺ T cells was analyzed by flow cytometry. Mice immunized with QB-80 adjuvanted formulations showed an increase in intracellular IFN- γ production by CD4⁺ T cells (Fig. 7A) and by CD8⁺ T cells (Fig. 7B) when compared with unadjuvanted formulation. These results indicate that QB-80 adjuvanted formulations are able to induce antigen-specific activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

4. Concluding remarks

Alum remains as the most widely used adjuvant for BVDV vaccines, although commercial saponins (extracted from *Q. saponaria* barks) have been included in some veterinary vaccines in addition

to alum and oils, but several side effects have been observed with the use of these metabolites. *Q. brasiliensis* saponin fractions (obtained from leaves extracts), and in particular AE and QB-80, have proven to be safer than currently commercially available saponins and also capable of eliciting major immune responses against specific viral antigens in mice [23,24,26,27]. In addition, they have been shown to trigger a mixed Th1/Th2 immune response, which is fundamental for preventing a viral infection as well as an *in utero* BVDV infection. Last but not least, AE formulations have proven to provide dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines, which is very promising in terms of optimization of current BVDV vaccines. Although promising, such studies were performed in mice; and thus, further research should be conducted in order to determine if the adjuvant effect elicited in mice by these *Q. brasiliensis* saponins fractions is also elicited in cattle, the BVDV host species. On the other hand, although a specific humoral and cellular immune response is induced by AE and QB-80 adjuvanted formulations (which is stronger than that elicited by the alum formulation), a challenge study with BVDV should be performed in order to test the efficacy of the *Q. brasiliensis* saponins adjuvanted BVDV vaccines. In addition, our studies were performed using only BVDV-1 antigens. However, in further studies, BVDV-2 antigens must be included (as is in commercially available BVDV vaccines) in order to broaden the scope of protection of the vaccine.

Acknowledgements

The present investigation was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) project grant code number FMV_2014_1_104823 and postgraduate fellowship to MRP (fellowship code POS_FMV_2015_1_1005280). This work was supported also by the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA – Uruguay), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil) (Grant No. 303432/2015-2) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP – Brazil) proj. SANIMARS (No. 01.10.0783.04). PMR is a CNPq 1A research fellow. PMR and AGFN are the recipients of CNPq research productivity fellowships, levels 1A and 1B, respectively. FS is a recipient of ANII research productivity fellowship, level 1.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interests related to this manuscript.

References

- [1] Brodersen BW. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol* 2014;51(2):453–64.
- [2] Walz PH, Grooms DL, Passler T, Ridpath JF, Tremblay R, Step DL, et al. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J Vet Intern Med* 2010;24(3):476–86.
- [3] Ridpath JF. Classification and molecular biology. In: Goyal SM, Ridpath JF, editors. *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control* Ames, IA: Blackwell Publishing; 2005. p. 65–80.
- [4] Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994 Sep;203(2):260–8.
- [5] Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, et al. Genus *Pestivirus*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego, CA, USA: International Union of Microbiological Societies Virology Division. Elsevier; 2012. p. 1010–4.
- [6] Ridpath JF, Bolin SR. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 1998;12(2):101–6.
- [7] Kelling CL. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004;20(1):115–29.
- [8] Newcomer BW, Walz PH, Givens MD, Wilson AE. Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis. *Theriogenology* 2015;83(3):360–5 e1.
- [9] Ludemann LR, Katz JB. Enzyme-linked immunosorbent assay assessment of bovine viral diarrhoea virus antigen in inactivated vaccines using polyclonal or monoclonal antibodies. *Biologicals* 1994;22(1):21–7.
- [10] Spickler AR, Roth JA. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med* 2003;17(3):273–81.
- [11] Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis* 2000;30(Suppl 3):S266–70.
- [12] Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Saf* 2015;38(11):1059–74.
- [13] Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *J Control Release* 2014;28(190):563–79.
- [14] Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw* 2015;15(2):51–7.
- [15] Garçon Nathalie HS, Friede M. Evolution of adjuvants across the centuries. In: Saunders, editor. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier, 2013, p. 58–70.
- [16] Rey-Ladino J, Ross AG, Cripps AW, McManus DP, Quinn R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine* 2011;29(38):6464–71.
- [17] Rosales-Mendoza S, Salazar-Gonzalez JA. Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. *Expert Rev Vacc* 2014;13(6):737–49.
- [18] Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol* 1991;146(2):431–7.
- [19] Dalsgaard K. Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch* 1974;44(3):243–54.
- [20] Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 2009;27(12):1787–96.
- [21] Zhu D, Tuo W. QS-21: A potent vaccine adjuvant. *Nat Prod Chem Res* 2016;3(4).
- [22] O'Hagan DT, Fox CB. New generation adjuvants—from empiricism to rational design. *Vaccine* 2015;33(Suppl 2):B14–20.
- [23] Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marques 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.
- [24] De Costa F, Yendo AC, Cibulski SP, Fleck JD, Roehe PM, Spilki FR, et al. Alternatively 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.
- [25] 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.
- [26] Yendo AC, de Costa F, Cibulski SP, Teixeira TF, Colling LC, Mastrogianni 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* 2016;34(20):2305–11.
- [27] Cibulski SP, Silveira F, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, dos Santos HF, Yendo AC, et al. *Quillaja brasiliensis* saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhoea virus vaccine in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016;45:1–8.
- [28] 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: Fox CB, editor. *Vaccine adjuvants methods and protocols*. 2016/10/09 ed. New York: Humana Press, 2017. p. 87–93.
- [29] Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, Quirici L, Roehe PM, Ferreira F, et al. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* 2016;34(9):1162–71.
- [30] 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.
- [31] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 1994;136(3–4):309–23.
- [32] Hedman K, Rousseau SA. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J Med Virol* 1989;27(4):288–92.
- [33] Kite GC, Howes MJ, Simmonds MS. 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.
- [34] 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.
- [35] Nord LI, Kenne L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydr Res* 2000;329(4):817–29.
- [36] Guo S, Kenne L, Lundgren LN, Ronnberg B, Sundquist BG. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* 1998;48(1):175–80.
- [37] Kauffmann C, Machado AM, Fleck JD, Provensi G, Pires VS, Guillaume D, et al. Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Nat Prod Res* 2004;18(2):153–7.
- [38] 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* 2017;20:228–33.
- [39] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787–93.
- [40] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17(3):138–46.
- [41] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8(3):275–83.
- [42] Garlapati S. Do we know the Th1/Th2/Th17 determinants of vaccine response? *Expert Rev Vacc* 2012;11(11):1307–10.
- [43] Letvin NL, Bloom BR, Hoffman SL. Prospects for vaccines to protect against AIDS, tuberculosis, and malaria. *JAMA* 2001;285(5):606–11.
- [44] Oleszycka E, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr Opin Immunol* 2014;28:1–5.
- [45] Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996;13(1–2):1–55.
- [46] Olafsdottir T, Lindqvist M, Harandi AM. Molecular signatures of vaccine adjuvants. *Vaccine* 2015;33(40):5302–7.
- [47] Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Adjuvants in the driver's seat: how magnitude, type, fine specificity and longevity of immune responses are driven by distinct classes of immune potentiators. *Vaccines (Basel)* 2014;2(2):252–96.
- [48] Lynch HE, Stewart SM, Kepler TB, Sempowski GD, Alam SM. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen. *J Immunol Methods* 2014;404:1–12.
- [49] Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138(11):3688–94.
- [50] 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.

Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Formulation of IMXQB: Nanoparticles Based on <i>Quillaja brasiliensis</i> Saponins to be Used as Vaccine Adjuvants	
Copyright Year	2022	
Copyright Holder	The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature	
Author	Family Name	Rivera-Patron
	Particle	
	Given Name	Mariana
	Suffix	
	Division	Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina
	Organization	Universidad de la República
	Address	Montevideo, Uruguay
Author	Family Name	Cibulski
	Particle	
	Given Name	Samuel P.
	Suffix	
	Division	Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia—CBiotec
	Organization	Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária
	Address	João Pessoa, Paraíba, Brazil
Author	Family Name	Miraballes
	Particle	
	Given Name	Iris
	Suffix	
	Division	Cátedra de Inmunología Clínica-Dpto, BIOCLIN
	Organization	Universidad de la República
	Address	Montevideo, Uruguay
	Division	Laboratorio de Biotecnología-Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química
	Organization	Universidad de la República
	Address	Montevideo, Uruguay
Corresponding Author	Family Name	Silveira
	Particle	
	Given Name	Fernando
	Suffix	
	Division	Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Organization Universidad de la República
Address Montevideo, Uruguay

Abstract

Adjuvants are essential components of subunit, recombinant, nonreplicating and killed vaccines, as they are substances that boost, shape, and/or enhance the immune response triggered by vaccination. Saponins obtained from the Chilean *Q. saponaria* tree are used as vaccine adjuvants in commercial vaccines, although they are scarce and difficult to obtain. In addition, tree felling is needed during its extraction, which has ecological impact. *Q. brasiliensis* leaf-extracted saponins arise as a more sustainable alternative, although its use is still limited to preclinical studies. Despite the remarkable immunostimulating properties of saponins, they are toxic to mammalian cells, due to their intrinsic characteristics. For these reasons they are mostly used in veterinary vaccines, although recently the *Q. saponaria* purified saponin QS-21 has been included in adjuvant systems for human vaccines, such as Mosquirix and Shingrix (GSK). In order to abrogate the toxicity of the saponins fractions, they can be formulated as immunostimulating complexes (ISCOMs). ISCOM-matrices are cage-like nanoparticles of approximately 40 nm, formulated combining saponins and lipids, without antigen, and are great adjuvants able to promote Th1-biased immune responses in a safe manner. Herein we describe how to formulate ISCOM-matrices nanoparticles using *Q. brasiliensis* purified saponin fractions (IMXQB) by the dialysis method. In addition, we indicate how to verify the appropriate size and homogeneity of the formulated nanoparticles.

Keywords

(separated by '-')

Saponins - Adjuvants - *Quillaja brasiliensis* - Nanoparticles - ISCOMs -
Dialysis - HR-TEM - DLS

Formulation of IMXQB: Nanoparticles Based on *Quillaja brasiliensis* Saponins to be Used as Vaccine Adjuvants

Mariana Rivera-Patron, Samuel P. Cibulski, Iris Miraballes,
and Fernando Silveira

Abstract

Adjuvants are essential components of subunit, recombinant, nonreplicating and killed vaccines, as they are substances that boost, shape, and/or enhance the immune response triggered by vaccination. Saponins obtained from the Chilean *Q. saponaria* tree are used as vaccine adjuvants in commercial vaccines, although they are scarce and difficult to obtain. In addition, tree felling is needed during its extraction, which has ecological impact. *Q. brasiliensis* leaf-extracted saponins arise as a more sustainable alternative, although its use is still limited to preclinical studies. Despite the remarkable immunostimulating properties of saponins, they are toxic to mammalian cells, due to their intrinsic characteristics. For these reasons they are mostly used in veterinary vaccines, although recently the *Q. saponaria* purified saponin QS-21 has been included in adjuvant systems for human vaccines, such as Mosquirix and Shingrix (GSK). In order to abrogate the toxicity of the saponins fractions, they can be formulated as immunostimulating complexes (ISCOMs). ISCOM-matrices are cage-like nanoparticles of approximately 40 nm, formulated combining saponins and lipids, without antigen, and are great adjuvants able to promote Th1-biased immune responses in a safe manner. Herein we describe how to formulate ISCOM-matrices nanoparticles using *Q. brasiliensis* purified saponin fractions (IMXQB) by the dialysis method. In addition, we indicate how to verify the appropriate size and homogeneity of the formulated nanoparticles.

Keywords Saponins, Adjuvants, *Quillaja brasiliensis*, Nanoparticles, ISCOMs, Dialysis, HR-TEM, DLS

1 Introduction

Adjuvants are components added to vaccines in order to potentiate, modulate, or extend the immune response triggered by antigens, which can be poorly immunogenic. For more than 50 years, aluminum salts were the only adjuvants used in human vaccines, as they have proven to be safe and well tolerated, despite the fact that their mechanism of action was not and remains to be fully elucidated. However, the search for new natural or synthetic substances to be

used as adjuvants that are safe, well tolerated and able to trigger cellular immune responses, of utmost importance to combat intracellular pathogens-infected and cancer cells, is a relentless task, that has seen advances only in recent years [1].

Saponins are steroid or triterpene glycosides produced by many plants, lower marine animals and some bacteria, in response to stress and several environmental factors [2]. Saponin fractions like Quil A[®] or purified saponin QS-21, extracted from the bark of *Quillaja saponaria* Molina, a native tree from Chile, are used in commercial vaccines as adjuvants in animal and human health [3]. Although they promote Th1-cell mediated immunity, their use has been limited due to the high toxicity that the amphiphilic nature of these molecules promotes in tissues by interacting with cholesterol in mammalian cell membranes. One strategy used to decrease the toxicity of saponin fractions, is to use them for formulation of immune stimulating complexes (ISCOMs).

ISCOMs were first described as vaccine adjuvants in 1984 [4]. They are cage-like structures of approximately 40 nm in diameter, that are obtained combining cholesterol, phospholipids, saponin fractions, and protein antigens in adequate proportions under proper conditions [4]. Among the many advantages of ISCOMs as vaccine adjuvants, it is important to highlight that they are able to trigger mixed Th1/Th2 immune responses, polarized toward the Th1 phenotype. The size of ISCOMs nanoparticles is appropriate not only for internalization by tissue-resident dendritic cells (DCs), but also for migrating by themselves from the injection site toward the draining lymph node (dLN), being internalized and processed by dLN resident DCs, followed by immediate presentation to T and B cells. For such reasons, among others, ISCOMs are considered to be an integrated adjuvant, effective as both as antigen delivery and immune-stimulating substances [5–7].

In spite of these advantages, commercial saponins are still mainly obtained from the peeled barks of adult trees, and thus, are not a readily renewable source [8]. Significant efforts are being deployed in order to obtain these compounds synthetically [9], but unfortunately, until now no synthetic source of saponins is available for commercial vaccines.

Saponins obtained from the leaves extract of *Q. brasiliensis*, a native tree from southern Brazil and Uruguay, either alone or formulated in ISCOMs nanoparticles, arise as an alternative to the commercially available *Q. saponaria* saponins [8, 10]. The use of these saponins presents two major advantages: (a) they are a readily sustainable option, not requiring the felling of the trees (as is the case *Q. saponaria* saponins), and (b) have chemical [11] and immunomodulatory [12, 13] properties similar to those of commercial saponins with milder side effects [14–16]. We have shown that *Q. brasiliensis* saponin-fractions promote long-term specific immune responses in experimental vaccines against several viral

antigens in mice model [13, 15–18] and confer dose-sparing effect [12]. In addition, we have also begun to elucidate their mechanism of action [19].

It has been widely reported that it is not needed to covalently attach the antigen to the ISCOM-nanoparticles in order to generate an antigen-specific immune response potentiated by these adjuvants, as long as the antigen is inoculated at the same time and site with them [5, 20]. This feature has also been observed for *Q. brasiliensis* saponins, as it has been reported that when ISCOMs are formulated without the antigen, but injected at the same time and site with it, identical immune response is observed [19].

This is a major finding that allows the production of a less complex product, the ISCOM-matrices nanoparticles using *Q. brasiliensis* purified saponin fractions without antigens (IMXQB), that can be used for many peptide antigens, regardless their specific characteristics, leading to an optimized biotechnological process, saving time and reducing costs for vaccines formulations that include these nanoparticles as adjuvants.

There are several methods to formulate ISCOM-like nanoparticles, such as ethanol injection [21], and dialysis, among others [22]. However, the experience in our group has led us to choose the dialysis method, as a higher yield can be achieved, and lesser variation among different batches has been observed.

Herein we describe a detailed protocol on how to formulate the IMXQB nanoadjuvant (without antigens) by the dialysis method. This protocol was developed mainly based on the method described by Mowat and Reid in 1995 [23], but introducing several changes. In addition, methods to confirm the size and shape of the nanoparticles, as well as the homogeneity of the formulation, are described. A scheme of the entire process is shown in Fig. 1.

2 Materials

To prepare all solutions use water for injection (WFI) and analytical grade reagents. Unless indicated otherwise, prepare all reagents at room temperature. For disposal of materials, please follow the waste disposal regulations. It is highly recommended to work under GLP (Good Laboratory Practices) conditions.

2.1 Formulation of IMXQB Nanoparticles

1. Prepare a 20% (w/v) MEGA-10[®] surfactant solution in WFI grade water (*see Note 1*).
2. Cholesterol ($\geq 99\%$).
3. Soy L- α -phosphatidylcholine (95%).
4. Chloroform.

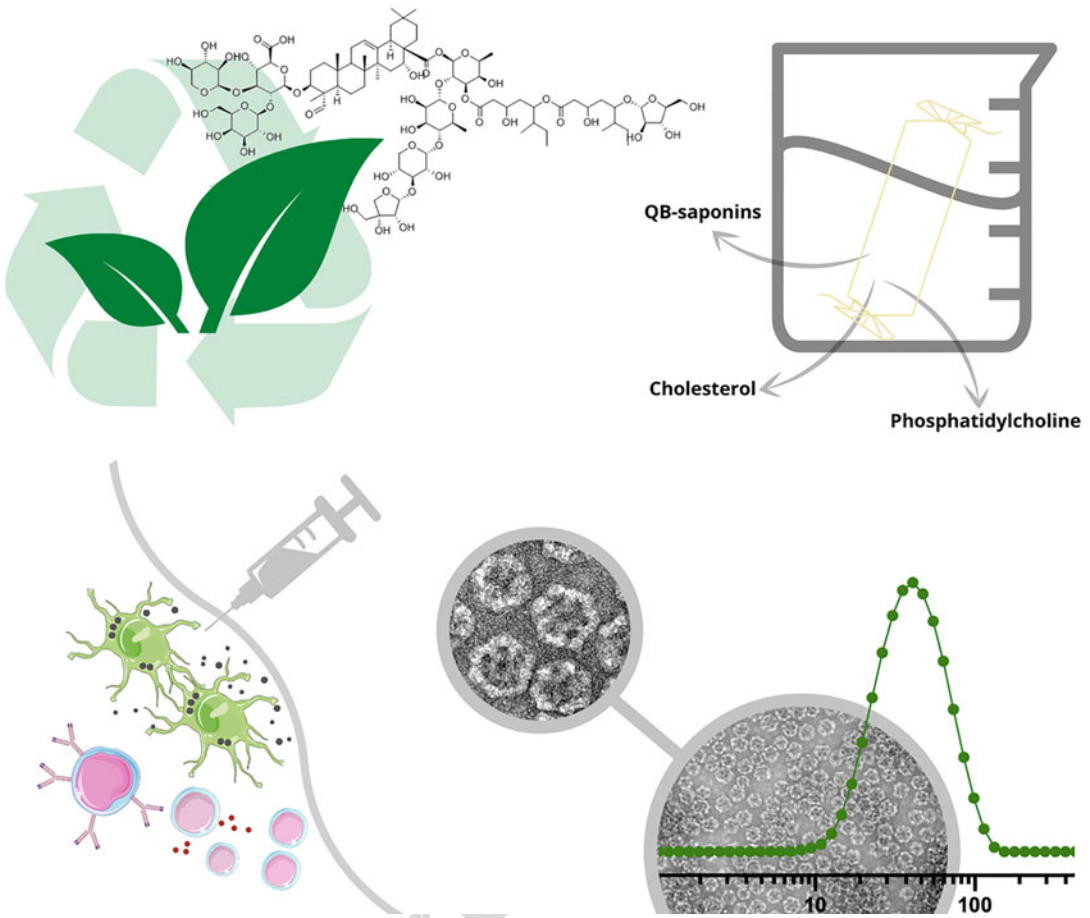


Fig. 1 Overview of IMXQB nanoparticles formulation and verification process. QB saponins are extracted from leaves of *Q. brasiliensis*; in order to abrogate their intrinsic toxic properties, QB saponins are mixed with lipids and assembled into ISCOM-like nanoparticles (IMXQB). These nanoparticles (40 nm of diameter in average) are characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). IMXQB are ready to use as immunoadjuvants, especially for inactivated, recombinant, and subunit vaccines

- 5. *Quillaja brasiliensis* saponins fractions (QB-90 or QB-80) [24].
- 6. Dialysis tubing of cellulose membrane (molecular weight cut-off: 14,000).
- 7. 50 mM Tris buffer, pH = 8.5.
- 8. Merthiolate (sodium ethylmercury salicylate).
- 9. PBS (phosphate-buffered saline, that is, 150 mM sodium chloride, 150 mM sodium phosphate) pH 7.4.
- 1. 2% Uranyl acetate solution.
- 2. 300 mesh Copper Ultrathin Carbon Film grid.
- 3. Zetasizer disposable cell (DTS1070 can be used).

2.2 High-Resolution Transmission Electronic Microscopy and Dynamic Light Scattering (DLS)

3 Methods

3.1 Formulation of IMXQB Nanoparticles by Dialysis Method

1. Prepare two solutions of 100 mg/mL, one of cholesterol and another of phosphatidylcholine, in chloroform.
2. Mix both solutions in a 1:1 (v/v) proportion, to obtain the “lipid mix.”
3. Add the lipid mix to the 20% MEGA-10[®] solution in a 1:6 (v/v) proportion, in a 50 mL conical tube. Introduce a magnetic spin bar and cover the tube with Parafilm[™].
4. Mix using a magnetically stirring system in a 45–50 °C environment. Stir the mixture until the solution becomes clear.
5. Prepare a 18:5:5 saponin–cholesterol–phosphatidylcholine (w/w/w) mixture, by adding the clarified solution (obtained in the previous step) to the *Q. brasiliensis*-saponin fraction. To obtain this ratio, take into account the original weight of cholesterol and phosphatidylcholine used to prepare the “lipid mix.” Add the adequate volume of WFI in order to obtain a final concentration of 3 mg/mL of the purified saponin fraction.
6. Mix *gently* until the saponins are dissolved completely. Please *see Note 2*.
7. Put the lipid mixture containing the purified saponin fractions into a prehydrated dialysis membrane and perform dialysis at 4–8 °C in 50 mM Tris buffer (pH 8.5) containing 0.01 mg/mL of Merthiolate.
8. Change the buffer solution every 12 h, during 5 days. The recommended volume of buffer is about 2000 × the mixture volume.
9. Change the buffer one last time, but replace the 50 mM Tris buffer (pH 8.5) containing Merthiolate by PBS (*without* Merthiolate). Perform dialysis during 12 h at 4–8 °C.
10. Sterilize by filtration through 0.22-μm filter in a laminar flow hood. Store at 4–8 °C until use, for a period of up to 2 years.
11. Take an aliquot in order to perform the “verification” steps, as described below.

Once formulation has been performed, it is important to verify its particle size, shape, and homogeneity. To this end, it is

3.2	recommended to visualize the formulation by Transmission Elec-	168
Verification Steps	tronic Microscopy, and measure diameter, electrophoretic mobility	169
	and Z-potential by DLS.	170
		171
3.2.1 Visualization of the	1. Place the sample in a 300 mesh Copper Ultrathin Carbon Film	171
Nanoparticles by High-	grid (UL, EMS).	172
Resolution Transmission	2. Stain it with 2% uranyl acetate (aqueous solution), during	173
Electron Microscopy (HR-	2 min at room temperature.	174
TEM)	3. Load the grid with the stained sample in a JEM-2100 (JEOL,	175
	Japan) high resolution transmission electron microscope, and	176
	visualize the nanoparticles operating the microscope at 200 kV	177
	accelerating voltage, and using a GATAN ORIOUS 1000 CCD	178
	camera, without filter. Nanoparticles should be visualized as	179
	shown in Fig. 2 (<i>see Note 3</i>).	180
		181
3.2.2 Particle Size	1. Dilute the nanoparticle formulation in triplicate to obtain dilu-	182
Measurement	tions of about 0.1% w/v of nanoparticles.	183
	2. Proceed to perform measurements of hydrodynamic diameter	184
	using the Dynamic Light Scattering technique. Zetasizer Nano	185
	ZS, and glass cell with round aperture (PCS8501) (Malvern	186
	Instruments) can be used.	187
	For suggested Standard Operating Procedure (SOP) para-	188
	meters, <i>see Note 4</i> .	189
	3. Record the averaged-from-three-measurements intensity	190
	weighted, Z-average diameter and polydispersity index (PDI)	191
	for each formulation. A graph type as shown in Fig. 3 should be	192
	obtained.	193
		194
3.2.3 Electrophoretic and	1. Dilute the nanoparticle formulation in triplicate to obtain dilu-	195
Zeta Potential	tions of about 0.1% w/v of nanoparticles.	196
Measurements	2. Measure zeta potential of dilutions. Zetasizer Nano ZS and	197
	disposable DTS1070 cell (Malvern Instruments, Ltd.) can	198
	be used.	199
	3. For suggested SOP parameters, <i>see Note 5</i> . Record the average	200
	of three measurements of electrophoretic mobility and zeta	201
	potential values. Table 1 shows an example of the obtained	202
	measurements.	203
		204

4 Notes

1. MEGA-10[®] can be difficult to dissolve, and foam can be gen- 205
erated. In order to ease dissolution, dissolve it at 37 °C, mix 206
gently, and avoid stirring strongly. 207
2. Do not stir vigorously, avoid foam formation. 208

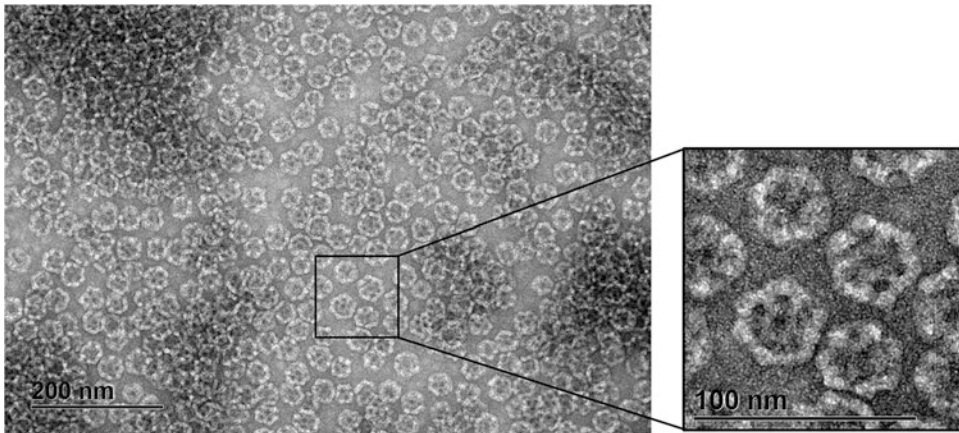


Fig. 2 IMXQB nanoparticles visualized by HR-TEM. IMXQB nanoparticles formulated with *Q. brasiliensis* QB-80 purified saponin fraction (without antigen) by the dialysis method and visualized by HR-TEM

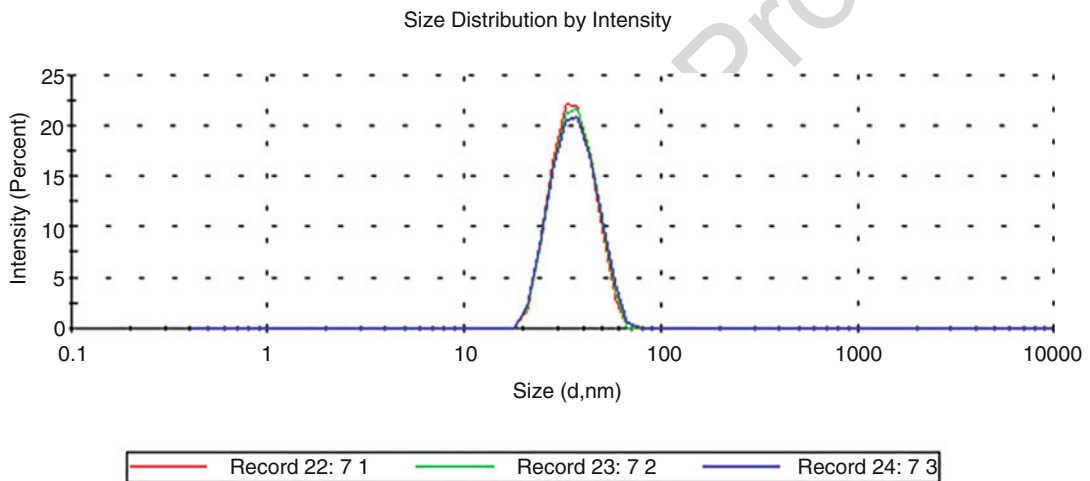


Fig. 3 Size distribution by intensity of the IMXQB nanoparticles by DLS. IMXQB nanoparticles formulated with *Q. brasiliensis* QB-80 saponin fraction (without antigen) by the dialysis method were measured by DLS and the size distribution by intensity is shown. The nanoparticles size of the formulation was of 36.8 ± 0.3 nm

3. When visualizing nanoparticles by MET, in case aggregates are observed, purify IMXQB nanoparticles by density gradient centrifugation [24], and perform again the “verification” steps.
4. Suggested SOP parameters for the Dynamic Light Scattering technique: material RI = 1.59, dispersant RI (water) = 1.33, $T = 25$ °C, viscosity (water) = 0.887 cP, measurement angle = 173° backscatter, measurement position = seek for optimum position, automatic attenuation.
5. Suggested SOP parameters for measuring the zeta potential: material RI = 1.59, dispersant RI (water) = 1.33, $T = 25$ °C,

Table 1
Z-potential and electrophoretic mobility of the IMXQB nanoparticles by DLS. IMXQB nanoparticles formulated with *Q. brasiliensis* QB-80 saponin fraction (without antigen) by the dialysis method were measured by DLS. Z-potential and the electrophoretic mobility values are shown

Z Potential (mV)	Electrophoretic mobility (μm.cm/Vs)
−5.4	−0.42
−7.6	−0.60
−9.6	−0.75
−7.5 ± 2.1 ^a	0.59 ± 0.17 ^a

^a The sample was measured three times for each parameter, and the averages ± standard deviations are shown

viscosity(water) = 0.887 cP, automatic attenuation and voltage selection.

Acknowledgments

The authors would like to thank BSc Álvaro D. Olivera of Laboratorio de Alta Resolución, Depto. Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República (CURE, Udelar) for his technical contribution operating the HR-MET in order to visualize the nanoparticles by this method. This work was supported by the ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) scholarship POS_NAC_2018_1_151537 granted to M.R.P. In addition, F.S. and M.R.P. are categorized within the Sistema Nacional de Investigadores of ANII, and are recipients of ANII research productivity fellowship, level 1, and initiation respectively. The authors thank the support of the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Uruguay), and to Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Udelar).

References

1. O'Hagan DT, Lodaya RN, Lofano G (2020) The continued advance of vaccine adjuvants—'we can work it out.'. *Semin Immunol* 50: 101426. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101426>

2. He Y, Hu Z, Li A et al (2019) Recent advances in biotransformation of saponins. *Molecules* 24:2365. <https://doi.org/10.3390/molecules24132365>

3. Lacaille-Dubois MA (2019) Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: a review. *Phytomedicine* 60:152905. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152905>

4. Morein B, Sundquist B, Höglund S et al (1984) Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 308:457–460. <https://doi.org/10.1038/308457a0>

5. Morelli AB, Becher D, Koernig S et al (2012) ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J Med Microbiol* 61: 935–943. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.040857-0>

- 264 6. Den Brok MH, Büll C, Wassink M et al (2016) Saponin-based adjuvants induce cross-
265 presentation in dendritic cells by intracellular
266 lipid body formation. *Nat Commun* 7:13324.
267 <https://doi.org/10.1038/ncomms13324>
268
- 269 7. Wilson NS, Yang B, Morelli AB et al (2012)
270 ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell
271 cross-priming by a MyD88-dependent signal-
272 ing pathway. *Immunol Cell Biol* 90:540–552.
273 <https://doi.org/10.1038/icb.2011.71>
- 274 8. Guerra F, Sepúlveda S (2020) Saponin produc-
275 tion from *Quillaja* genus species. An insight
276 into its applications and biology. *Sci Agric* 78:
277 1–9. [https://doi.org/10.1590/1678-992x-](https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0305)
278 [2019-0305](https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0305)
- 279 9. Fernández-Tejada A, Tan DS, Gin DY (2016)
280 Development of improved vaccine adjuvants
281 based on the saponin natural product QS-21
282 through chemical synthesis. *Accounts Chem*
283 *Res* 49:1741–1756. [https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00242)
284 [1021/acs.accounts.6b00242](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00242)
- 285 10. Magedans YVS, Yendo ACA, De Costa F et al
286 (2019) Foamy matters: an update on *Quillaja*
287 saponins and their use as immunoadjuvants.
288 *Future Med Chem* 11:1485–1499
- 289 11. Kauffmann C, Machado AM, Fleck JD et al
290 (2004) Constituents from leaves of *Quillaja*
291 *brasiliensis*. *Nat Prod Res* 18:153–157.
292 [https://doi.org/10.1080/](https://doi.org/10.1080/14786410310001608055)
293 [14786410310001608055](https://doi.org/10.1080/14786410310001608055)
- 294 12. Cibulski S, Rivera-Patron M, Suárez N et al
295 (2018) Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis*
296 enhance long-term specific immune responses
297 and promote dose-sparing effect in BVDV
298 experimental vaccines. *Vaccine* 36:55–65.
299 [https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.030)
300 [11.030](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.030)
- 301 13. Cibulski S, Teixeira TF, Varela APM et al
302 (2021) IMXQB-80: a *Quillaja brasiliensis*
303 saponin-based nanoadjuvant enhances Zika
304 virus specific immune responses in mice. *Vac-*
305 *cine* 39:571–579. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.004)
306 [vaccine.2020.12.004](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.004)
- 307 14. Fleck JD, Kauffmann C, Spilki F et al (2006)
308 Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* sapo-
309 nins on the immune responses to bovine her-
310 pesvirus type 1 in mice. *Vaccine* 24:
311 7129–7134. [https://doi.org/10.1016/j.vac-](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.059)
312 [cine.2006.06.059](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.059)
- 313 15. Cibulski SP, Silveira F, Mourglia-Ettlin G et al
314 (2016) *Quillaja brasiliensis* saponins induce
315 robust humoral and cellular responses in a
316 bovine viral diarrhea virus vaccine in mice.
317 *Comp Immunol Microb* 45:1–8. [https://doi.](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.004)
318 [org/10.1016/j.cimid.2016.01.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.004)
- 319 16. Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF
320 et al (2016) Novel ISCOMs from *Quillaja*
321 *brasiliensis* saponins induce mucosal and sys-
322 temic antibody production, T-cell responses
323 and improved antigen uptake. *Vaccine* 34:
324 1162–1171. [https://doi.org/10.1016/j.vac-](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029)
325 [cine.2016.01.029](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029)
- 326 17. Yendo ACA, De Costa F, Cibulski SP et al
327 (2016) A rabies vaccine adjuvanted with sapo-
328 nins from leaves of the soap tree (*Quillaja*
329 *brasiliensis*) induces specific immune responses
330 and protects against lethal challenge. *Vaccine*
331 34:1–7. [https://doi.org/10.1016/j.vaccine.](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.070)
332 [2016.03.070](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.070)
- 333 18. De Costa F, Yendo ACA, Cibulski SP et al
334 (2014) Alternative inactivated poliovirus vac-
335 cines adjuvanted with *Quillaja brasiliensis* or
336 Quil-A saponins are equally effective in induc-
337 ing specific immune responses. *PLoS One* 9:
338 e105374. [https://doi.org/10.1371/journal.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105374)
339 [pone.0105374](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105374)
- 340 19. Cibulski SP, Rivera-Patron M, Mourglia-Ettlin
341 G et al (2018) *Quillaja brasiliensis* saponin-
342 based nanoparticulate adjuvants are capable of
343 triggering early immune responses. *Sci Rep* 8:
344 13582. [https://doi.org/10.1038/s41598-](https://doi.org/10.1038/s41598-018-31995-1)
345 [018-31995-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-31995-1)
- 346 20. Bolduc M, Baz M, Laliberté-Gagné MÈ et al
347 (2018) The quest for a nanoparticle-based vac-
348 cine inducing broad protection to influenza
349 viruses. *Nanomed Nanotechnol* 14:
350 2563–2574. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.010)
351 [nano.2018.08.010](https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.010)
- 352 21. Lendemans DG, Myschik J, Hook S, Rades T
353 (2005) Immuno-stimulating complexes
354 prepared by ethanol injection. *J Pharm Phar-*
355 *macol* 57:729–733. [https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1211/0022357056280)
356 [1211/0022357056280](https://doi.org/10.1211/0022357056280)
- 357 22. Myschik J, Lendemans DG, McBurney WT
358 et al (2006) On the preparation, microscopic
359 investigation and application of ISCOMs.
360 *Micron* 37:724–734. [https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.016)
361 [1016/j.micron.2006.03.016](https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.016)
- 362 23. Mowat AM, Reid G (1995) Preparation of
363 immune stimulating complexes (ISCOMs) as
364 adjuvants. In: Coligan JE (ed) *Current proto-*
365 *cols in immunology*. Wiley, New York
- 366 24. Yendo ACA, De Costa F, Kauffmann C et al
367 (2017) Purification of an immunoadjuvant
368 saponin fraction from *Quillaja brasiliensis*
369 leaves by reversed-phase silica gel
370 chromatography. In: Fox CB (ed) *Vaccine*
371 *adjuvants: methods and protocols*. Springer
372 Science+Business Media, New York

Author Queries

Chapter No.: 15	498948_2_En
-----------------	-------------

Query Refs.	Details Required	Author's response
AU1	Please check and confirm if the authors name and affiliations are presented correctly.	
AU2	Please check if 'Tris buffer, pH' should be changed to 'Tris-HCl buffer, pH' in the chapter.	
AU3	Please check if table and table footnote are presented correctly.	