



NUEVOS ADYUVANTES BASADOS EN SAPONINAS DE LA FLORA SUDAMERICANA

MSc. Luis Fernando Silveira Gonzalez

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

PEDECIBA-Biología

Orientador: Dr. Fernando A. Ferreira Chiesa

Co-orientadora: Dra. Cecilia Fernández Granja

Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados

Departamento de Desarrollo Biotecnológico

Instituto de Higiene-Facultad de Medicina

Universidad de la República

2011

A Pedro, Hernán y Rafa

Agradecimientos

Quería empezar esta sección, agradeciendo en general, a mis compañeros del Instituto de Higiene por las cosas que hemos compartido. En particular, a mis amigas de la sección personal docente (Lau y Elena), como también a mis compañeros de personal no docente y contaduría.

Mi agradecimiento especial a los funcionarios del antiguo Departamento de Producción y Control de Vacunas (Instituto de Higiene), donde ingrese como Laboratorista en 1993 quienes me transmitieron sus conocimientos sobre los procesos de producción y control de vacunas y suero antiofídico que aquí se producían: Beatriz, Myria, Esther, Teresa, Nelson, Marta, Gustavo, Araceli, Clarita. Puntualmente mi agradecimiento a Anita Mourín quien me transmitió además de su afecto sus conocimientos, su gran destreza y motivación en el uso de los animales de experimentación.

A mis tutores Fernando Ferreira y Cecilia Fernández. A Fernando, por darme la oportunidad de desarrollar mi posgrado en un área del conocimiento, que hasta ese momento no tenía idea que existía y por su asesoramiento visionario y académico. A Cecilia, por haber aceptado ser co-tutora de este trabajo, por su dedicación, sus observaciones críticas y paciencia en la corrección de los artículos y en la redacción de la tesis.

A mi amiga Silvina Rossi, que siempre con paciencia y cariño me enseña a analizar de forma crítica la inmunología y en especial a sacar datos confiables de la técnica de "doña" ELISA.

A mis compañeros y amigos del actual Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Norma (Uarez), Andrea, Juancho, Luli, Rosina, Natalia, Leonora, María Inés, Marcia (positiva), Humberto, Silvia (Oule). En particular a Pablo Spinelli con quien comenzamos este trabajo.

A toda la gente de la UBP, Gabi, Tati, Carlos, Martín, Patricia con quienes además de compartir jornadas de trabajo sabemos darnos nuestros momentos de pausa y en los almuerzos CON APLAUSOS, reírnos de nosotros mismos. Gracias por estar...

A mis amigos de inmunología, Ceci (soñada), Gus, Martín (rissoto), Maca.

A mis profesores en Porto Alegre (Brasil) Grace Gosmann (Faculdade de Farmacia, UFRGS) y Paulo Roehe (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor y UFRGS). En especial muchas

gracias, a mis amigos y colegas brasileños Samuel (samuka), Ana Paula (pequeño hámster), Thais, María Paula, Diógenes, Carine (ex-maestra) y Simone Verza, así como también a los funcionarios del Instituto Desiderio Finamor por hacerme sentir como en casa. A su vegetación y orquídeas que me cautivaron desde el primer día.

A las siguientes organizaciones que apoyaron de distinta forma este trabajo: en Uruguay al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), a la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) por la adjudicación de una beca de posgrado para realizar este doctorado, y al Laboratorio Santa Elena y su personal. En Brasil al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) y Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A mis padres, hermanos (Mabel y Luis, Rosario, Mario y Laura, María Betania, Agustín, Cuca) y sobrinos (Gabriela, Natalia, María Noel, Gonzalo y Matías).

...La ciencia moderna ha partido a la humanidad en un 10% que tiene ciencia (el Primer Mundo) y un 90% restante (el Tercer Mundo) donde la gente produce, viaja, se comunica, se cura y se mata con aparatos, vehículos, teléfonos, redes computacionales, medicamentos y armas que inventaron los del primero... y por supuesto, se hunde en dependencias, deudas, desocupaciones, miserias, hambre, y se anega en el más desesperante "analfabetismo científico". Pero un país no es necesariamente dependiente y miserable cuando carece de dinero, sino cuando hay otros que lo interpretan mejor. Si quienes mejor interpretan la realidad japonesa no fueran los japoneses, Japón sería un país subdesarrollado.

Hay países que tienen una cultura compatible con la ciencia, y en caso de problemas de salud, energía, transporte, comunicación, bélicos o económicos, encomiendan su solución a sus científicos, institutos y universidades. Otros no lo logran o, más comúnmente, ni se les pasó por la cabeza intentarlo. ¿Y la Argentina?Y Uruguay?

Prólogo modificado del libro Darwin 2.0 por Marcelino Cereijido

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. INMUNIZACIÓN	5
1.2. DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS: ANTÍGENOS Y ADYUVANTES	8
1.3. RELACIÓN ENTRE LA INMUNIDAD INNATA, LA ADQUIRIDA Y EL ADYUVANTE	10
1.4. POBLACIONES DE CÉLULAS T: EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y ESTIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS	12
1.5. CLASIFICACIÓN DE ADYUVANTES	18
1.5.1. <i>Clasificación I: adyuvantes que promueven una liberación controlada de antígeno e inmunoestimuladores</i>	18
1.5.2. <i>Clasificación II: adyuvantes de primera y segunda generación</i>	18
1.6. ADYUVANTES UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE VACUNAS	21
1.6.1. <i>Sales minerales</i>	21
1.6.2. <i>Partículas lipídicas</i>	22
1.6.3. <i>Liposomas</i>	23
1.6.4. <i>Agonistas de TLRs</i>	24
1.6.4.1. <i>Monofosforil Lípido A (MPL)</i>	24
1.6.4.2. <i>Oligonucleótidos: Dinucleótidos no metilados (CpG)</i>	24
1.6.5. <i>Saponinas</i>	25
1.6.5.1. <i>Propiedades inmunomoduladoras</i>	26
1.6.5.2. <i>Efectos tóxicos</i>	30
1.6.6. <i>Formulaciones micelares de saponinas</i>	31
1.7. MECANISMOS PROPUESTOS PARA EXPLICAR LA ACTIVIDAD ADYUVANTE	35
1.7.1. <i>Alúmina</i>	37
1.7.2. <i>Saponinas con especial énfasis en Quil A</i>	38
1.7.2.1. <i>Participación de los grupos funcionales de la aglicona en la actividad adyuvante</i>	38
1.7.2.2. <i>Participación de los residuos oligosacáridicos en la actividad adyuvante</i>	39
1.7.3. <i>Formulaciones micelares</i>	40
1.8. EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD ADYUVANTE	42
1.8.1. <i>Ensayos de citotoxicidad (hemólisis y viabilidad celular)</i>	42
1.8.2. <i>Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG total e isotipos de IgG y ensayo de sero-neutralización)</i>	43
1.8.3. <i>Evaluación de la respuesta inmune celular (DTH y expresión de citoquinas)</i>	43
1.9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
1.10. HIPÓTESIS	47
1.11. OBJETIVOS	48
2. MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1. MATERIALES	50

2.2. MATERIALES DE ORIGEN VEGETAL.....	50
2.3. FORMULACIÓN DE LOS CSS.....	55
2.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD.....	56
2.4.1. <i>Ensayos de actividad hemolítica</i>	56
2.4.1.1. Ensayo de la actividad hemolítica de saponinas de <i>Ilex spp.</i> y <i>Passiflora alata</i>	56
2.4.1.2. Ensayo de la actividad hemolítica de saponinas de <i>Quillaja brasiliensis</i> (QB-90U).....	57
2.4.1.3. Ensayo de la actividad hemolítica de los CSS.....	57
2.4.2. <i>Ensayo de toxicidad utilizando células VERO</i>	57
2.5. PREPARACIÓN ANTIGÉNICA DE BoHV-5.....	58
2.6. PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN.....	59
2.6.1. <i>Protocolo para el estudio de saponinas de Ilex spp. y Passiflora alata</i>	60
2.6.2. <i>Protocolo para el estudio de saponinas de Quillaja brasiliensis (QB-90U)</i> ..	60
2.6.3. <i>Protocolo para el estudio de CSS</i>	61
2.6.3.1 Inmunización de ratones.....	61
2.6.3.2 Inmunización de ovejas.....	61
2.7. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS.....	62
2.7.1. <i>Anticuerpos anti-TT</i>	62
2.7.2. <i>Anticuerpos anti-BoHV-5</i>	63
2.8. ENSAYO DE SERO-NEUTRALIZACIÓN (SN).....	64
2.9. REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH).....	64
2.9.1. <i>Respuesta de DTH luego de la inmunización con TT</i>	64
2.9.2. <i>Respuesta de DTH luego de la inmunización con BoHV-5</i>	65
2.10. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS.....	65
2.11. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE CITOQUINAS.....	66
2.12. TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELÉCTRICA DE TRANSMISIÓN (TEM) POR TINCIÓN NEGATIVA.....	67
2.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	68
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
3.1. SAPONINAS DE LA FLORA NATIVA COMO ADYUVANTES DE VACUNACIÓN.....	70
3.1.1. <i>Saponinas purificadas de Ilex spp. y Passiflora alata</i>	70
3.1.1.1. Las saponinas de <i>Ilex spp</i> y <i>Passiflora alata</i> son poco hemolíticas.....	70
3.1.1.2. Algunas saponinas de <i>Ilex spp.</i> y <i>Passiflora alata</i> poseen una actividad adyuvante similar a la de la alúmina.....	71
3.1.1.3. Comentarios finales.....	75
3.1.2. <i>Saponinas de Quillaja brasiliensis (QB-90U)</i>	77
3.1.2.1. Las saponinas de QB-90U son significativamente menos tóxicas que las saponinas de Quil A.....	77
3.1.2.2. Las saponinas de QB-90U inducen altos niveles de IgG anti-BoHV-5 que contiene anticuerpos neutralizantes.....	80
3.1.2.3. Al igual que las de Quil A, las saponinas de QB-90U inducen la generación de células T CD4 ⁺ con fenotipo Th1.....	83
3.1.2.4. Comentarios finales.....	88
3.2. MICELAS MIXTAS DE SAPONINAS DE Q. SAPONARIA COMO ADYUVANTES DE VACUNACIÓN.....	90
3.2.1. <i>La inclusión de saponinas de Q. saponaria en estructuras micelares mixtas reduce su actividad hemolítica</i>	90
3.2.2. <i>La formación de las micelas mixtas CSS es un proceso lento</i>	93

3.2.3. <i>Las micelas mixtas CSS poseen estructuras filiformes</i>	95
3.2.4. <i>La formulación CSS induce una fuerte respuesta humoral</i>	96
3.2.5. <i>Comentarios finales</i>	105
4. DISCUSIÓN GENERAL	106
5. BIBLIOGRAFÍA	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales señales de activación de células T CD4+ vírgenes	13
Figura 2. Modelo bifásico de diferenciación celular a Th2.....	15
Figura 3. Esquema general de diferenciación de células T cooperadoras.	17
Figura 4 Estructura de la saponina QS-21 aislada de <i>Quillaja saponaria</i>	27
Figura 5. Microfotografía electrónica de trasmisión (TEM) de ISCOMs [160]	32
Figura 6. La activación de las DC puede ocurrir por múltiples mecanismos.....	35
Figure 7 Árbol y flor de <i>Ilex paraguariensis</i>	51
Figura 8. Planta y flor de <i>Passiflora alata</i>	51
Figura 9. Origen y estructura química de las saponinas de <i>Ilex</i> y <i>Passiflora</i> spp. ensayadas.	53
Figura 10 Árbol, fruto y distribución en Uruguay de <i>Quillaja brasiliensis</i>	54
Figura 11. Evolución de los títulos de IgG contra TT.	72
Figura 12. Títulos de anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b anti-TT.	74
Figura 13. Respuesta de DTH en los ratones inmunizados con TT.....	75
Figura 14. Toxicidad <i>in vitro</i> de QB-90U y Quil A.	78
Figura 15. Respuesta de títulos de anticuerpos de ratones inmunizados con BoHV-5. 81	
Figura 16. Títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de ratones inmunizados... 83	
Figura 17. Reacción de DTH en ratones inmunizados con BoHV-5.....	84
Figura 18. Ensayos de proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados	85
Figura 19. Expresión de citoquinas tipo Th1 (IFN- γ e IL-2).....	87
Figura 20. Actividad hemolítica de <i>Q. saponaria</i> (SQS) y <i>Gypsophila</i> sp. (SG).....	91
Figura 21. Actividad hemolítica de diferentes formulaciones CSS para distintas concentraciones de SQS y relaciones esteroles/saponina (parámetro q).....	92
Figura 22. Actividad hemolítica de las formulaciones CSS en función del tiempo y de la composición (q).	94
Figura 23. Microfotografía electrónica de trasmisión (TEM) de micelas de CSS con tinción negativa.	95
Figura 24. Evolución de los títulos de anticuerpos de IgG total contra TT en ratones. . 97	
Figura 25. Títulos de anticuerpos de las subclases de IgG1, IgG2a and IgG2b contra TT en ratones.....	98

Figura 26. Evolución de los títulos de IgG total contra TT en ovejas.....	101
Figura 27. Títulos de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2 contra TT en ovejas. .	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Adyuvantes probados en vacunas para uso humano.....	7
Tabla 2. Activación de la respuesta inmune innata y adaptativa por la acción de diferentes adyuvantes.....	20
Tabla 3. Saponinas con actividad adyuvante aisladas en los últimos años.....	29
Tabla 4. Secuencia de los “primers” utilizados para la RT-qPCR.....	67
Tabla 5. Actividad hemolítica de saponinas de <i>Ilex</i> y <i>Passiflora spp.</i> 1 – 5.....	71

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- APC: célula presentadora de antígeno (del inglés, “antigen presenting cell”)
- ARNm: ARN mensajero
- ATCC: colección de líneas celulares tipo de Estados Unidos (del inglés, “American Type Culture Collection”)
- BoHV-5: virus herpes bovino tipo 5 (del inglés, “Bovine Herpesvirus type 5”)
- BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, “bovine serum albumin”)
- CFA: adyuvante completo de Freund (del inglés, complete Freund’s adjuvant)
- CH50: concentración hemolítica 50
- CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR
- ConA: concanavalina A
- CpG: di nucleótidos CG en el ADN
- CSS: complejos supramoleculares de saponinas
- CTL: linfocitos T citotóxicos
- DAMP(s): patrón(es) molecular(es) asociado(s) a daño tisular (del inglés, “damage associated molecular pattern(s)”)
- DC: célula(s) dendrítica(s) (del inglés, “dendritic cell(s)”)
- DO: densidad óptica
- DTH: hipersensibilidad de tipo retardado
- E: esteroides
- ELISA: enzimoimmunoensayo (del inglés, “enzyme-linked immunosorbent assay”)
- E-MEM: medio mínimo de Eagle (del inglés, “Eagle’s minimal essential medium”)
- FBS: suero fetal bovino (del inglés, “fetal bovine serum”)
- HPLC-RP: cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (del inglés, high performance liquid chromatography-Reverse Phase)
- IFA: adyuvante incompleto de Freund (del inglés, incomplete Freund’s adjuvant)
- IL: interleuquina
- Lf: unidades de floculación (definición provista por la OMS en donde Lf significa “limes flocculationis”)
- LPS: lipopolisacárido (del inglés, “lipopolysaccharide”)

MDBK: Células Madin Darby de riñón de bovino (del inglés, “*Madin Darby Bovine Kidney cells*”)

MM: micelas mixtas

MPL: monofosforil lipido A (del inglés, “*monophosphoryl lipid A*”)

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio

NO: óxido nítrico (del inglés, “*nitric oxide*”)

OPD: orto-fenilendiamina (del inglés, “*ortho-phenylenediamine*”)

PAMP(s): patrón(es) molecular(es) asociado(s) a patógenos (del inglés, “*pathogen-associated molecular pattern(s)*”)

PBS/T/BSA: PBS/T conteniendo BSA

PBS/T: PBS conteniendo Tween-20

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés, “*phosphate-buffered saline*”)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, “*polymerase chain reaction*”)

PRRs: receptores de reconocimiento (del inglés, “*pattern recognition receptors(s)*”)

q: relación lípido (L)/saponina (S)

QB-90U: saponinas de *Quillaja brasiliensis* extraídas de plantas originarias de Uruguay

qPCR: PCR cuantitativa

s/c: vía de inoculación subcutánea

SE: error estándar de la media (del inglés, “*standard error of the mean*”)

SG: saponinas de *Gypsophila* sp. (SG)

SI: índice de estimulación (del inglés, “*stimulation index*”)

SQS: saponinas de *Quillaja saponaria*

TCID50: Dosis infectiva media de un cultivo celular (del inglés, “*Median tissue cultura infective dose*”)

TCR: receptor de la célula T (del inglés, “*T cell receptor*”)

TEM: microfotografía eléctrica de trasmisión (del inglés, “*transmission electron microscopy*”)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TT: toxoide tetánico

UA/mL: unidades arbitrarias/mL

VERO: células de riñón de mono verde africano (*Cercophitecus aethiops*)

En el contexto de esta tesis se generaron los siguientes artículos.

Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. F. Silveira, S. Rossi, C. Fernández, G. Gosmann, E. Schenkel and F. Ferreira. 2011. *Phytother. Res.* **25**: 1783-1788

***Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation.** F. Silveira, S.P. Cibulski, A.P. Varela, J.M. Marqués, A. Chabalgoity, F. de Costa, A.C.A. Yendo, G. Gosmann, P.M. Roehe, C. Fernández, F. Ferreira. 2011. *Vaccine* **29**: 9177-9182.

“Worm like” structures formulated with saponins from *Quillaja saponaria* and sterols are not haemolytic and have high adjuvant activity. En preparación.

RESUMEN

El uso de saponinas (glicósidos triterpénicos y esteroideos) como adyuvantes potenciales de vacunación ha sido motivo de estudio desde hace muchos años, tanto para la profilaxis de enfermedades infecciosas, así como también para tratamientos inmuno terapéuticos. En general, las saponinas de *Quillaja saponaria* y en particular la fracción de Quil A, al ser co-administradas con una gran variedad de antígenos han demostrado ser muy eficaces para desencadenar potentes respuestas inmunológicas de tipo humoral con la participación de células T CD4+ de fenotipo Th1 y celular con activación de linfocitos T CD8+. Sin embargo, su uso clínico en humanos se ha visto restringido debido a la gran actividad hemolítica que las caracteriza. Es así que el adyuvante utilizado en la mayoría de las vacunas de uso humano es el fosfato o hidróxido de aluminio conocido genéricamente como alúmina. Éste promueve una buena respuesta inmune humoral (alta producción de anticuerpos) con la participación de células T CD4+ de fenotipo Th2, pero carece de la capacidad para estimular la diferenciación de células T CD8+ (fundamentales para el combate de enfermedades producidas por patógenos intracelulares y el cáncer). En las últimas décadas se han desarrollado estudios que han logrado identificar saponinas de diversos orígenes que ya sea solas o formuladas como micelas mixtas, a la vez que presentan una baja o nula actividad hemolítica, son capaces de desencadenar potentes respuestas inmunes.

En esta tesis se estudia la actividad adyuvante, por una parte de saponinas pertenecientes a la flora sudamericana y por otra, de formulaciones micelares binarias de saponinas y esteroides. En el primer aspecto se presentan los resultados de estudios de la citotoxicidad *in vitro* y capacidad adyuvante de saponinas de *Ilex spp.*, *Passiflora alata* y *Quillaja brasiliensis*. Se analizó la respuesta inmune generada por las saponinas

cuando fueron co-administradas a ratones con diferentes antígenos proteicos (Toxoide tetánico o una suspensión de herpes virus bovino tipo-5 inactivado). Estos estudios mostraron que las saponinas de *Ilex* y *Passiflora* tienen un comportamiento similar a la alúmina, mientras que el de las saponinas de *Quillaja brasiliensis* es similar al que presenta Quil A. En el segundo aspecto, se describe la preparación de formulaciones micelares binarias en base a saponinas de *Quillaja saponaria* y esteroides, que demostraron poseer una baja actividad hemolítica junto con una intensa actividad adyuvante, al ser administradas con un antígeno proteico tanto a ratones como a ovinos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inmunización

La inducción deliberada de una respuesta inmunitaria se conoce como *inmunización*. Este proceso se caracteriza por su capacidad de desencadenar una respuesta protectora frente a un patógeno y de generar memoria. La exposición a un patógeno, posterior a una inmunización protectora, lleva a la eliminación del mismo o previene las enfermedades mediadas por sus productos. Las infecciones naturales con determinados microorganismos dan lugar a una inmunización protectora, lo que también se conoce como desarrollo de inmunidad. Este proceso es el que se busca reproducir mediante la administración de vacunas: el objetivo de la vacunación es la inducción de una respuesta inmune específica contra el antígeno utilizado en el proceso de inmunización, que dé como consecuencia la protección del individuo contra la infección y/o enfermedad causada por el patógeno [1]. La utilización de vacunas ha demostrado ser una herramienta eficaz en la prevención de enfermedades infecciosas: tanto la mortalidad como la morbilidad de las enfermedades para las cuales han sido desarrolladas vacunas adecuadas se han reducido sistemáticamente [2, 3].

Tradicionalmente, las tecnologías de producción de vacunas utilizaron tres tipos de productos como inmunógenos: microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos y las llamadas subunidades vacunales como los toxoides purificados. Con cualquiera de estas preparaciones ha sido posible obtener muy buena protección basada, principalmente, en la generación de anticuerpos [2, 4]. En los últimos años, la investigación en vacunas se ha orientado a utilizar antígenos definidos y productos

purificados como proteínas [5, 6] y péptidos recombinantes [1]. De esta forma, se pretende generar inmunidad utilizando preparaciones que no produzcan las reacciones adversas (dolor, ardor, eritema) desencadenadas por los antígenos crudos; y que no tengan la capacidad de revertir a formas virulentas en los individuos vacunados [1]. La pureza de los antígenos a menudo trae como consecuencia la reducción en su capacidad de inducir respuestas inmunes efectivas [7]. Por este motivo, desde la 1^{era} mitad del siglo pasado, se ha agregado a las preparaciones utilizadas para inmunizar “sustancias” capaces de mejorar la respuesta inmune, a las que se conocen con el nombre de *adyuvantes*. Los adyuvantes, descritos primariamente por Ramon (en 1924) [8], pueden ser definidos como un *conjunto de aditivos sumamente heterogéneo, que aumentan la inmunogenicidad de los antígenos* (moléculas reconocidas por anticuerpos y/o por el receptor de la célula T), *y modulan la repuesta inducida por la inmunización* [4, 9, 10]. El uso de adyuvantes se remonta a los primeros reportes de Freund (en 1942), quien utilizó preparaciones que aumentan la persistencia del antígeno y demostró el efecto potenciador de la respuesta inmune de extractos crudos de micobacterias [4, 11].

Como veremos más adelante, existe una gran variedad de adyuvantes (ver Tabla 1). En términos generales, el uso de adyuvantes ha permitido obtener formulaciones vacunales efectivas en cuanto a la generación de una respuesta de anticuerpos (inmunidad humoral) [7, 12, 13]. El desafío actual es formular adyuvantes capaces de generar protección mediante la activación de células T CD8⁺ (linfocitos T citotóxicos, CTLs, del inglés *cytotoxic T lymphocytes*), efectivas contra enfermedades por patógenos intracelulares así como también contra células tumorales [12, 14].

Tabla 1. Adyuvantes probados en vacunas para uso humano

Nombre	Laboratorio	Tipo de preparación	Ejemplos de uso	Estado
<i>Adyuvantes de primera generación</i>				
Alúmina	Varios	Sales de aluminio	Varias	<i>Licencia</i>
MF59	Novartis	Emulsión O/W	Gripe	<i>Licencia (EU)</i>
Liposomas	Crucell	Vesículas lipídicas	HAV/gripe	<i>Licencia (EU)</i>
Montanide	Varios	Emulsión W/O	Malaria/cáncer	<i>Fase III</i>
PLG	Novartis	Micropartículas poliméricas	Vacunas DNA (HIV)	<i>Fase I</i>
Flagelina	Vaxinnate	Agonista de TLR	Gripe	<i>Fase I</i>
QS21	Antigenics	Saponina	Varias	<i>Fase I</i>
<i>Adyuvantes de segunda generación (combinación de adyuvantes)</i>				
ASO1	GSK	MPL+ liposomas + QS21	Malaria, TB	Fase II
ASO2	GSK	MPL+ emulsión O/W + QS21	Malaria	Fase II
ASO3	GSK	Emulsión O/W + α tocopherol	Pandemia de gripe	Licencia (EU)
ASO4	GSK	MPL + Alúmina	HBV, HPV	Licencia (EU)
RC-259	Dynavax	MPL sintético + Alúmina	HBV	Fase II
ISCOMs	CSL, Isconova	Saponinas + colesterol + fosfolípidos	Varios	Fase I
IC31	Intercell	Péptidos + oligonucleótidos	TB	Fase I
CpG 7909	Coley/Pfizer Novartis	Oligonucleótidos + Alúmina + MF59	HBV, malaria, HCV	
ISS	Dynavax	Oligonucleótidos + Alúmina	HBV	Fase II
MF59+MTP-PE	Chiron/Novartis	MDP + emulsión O/W	HIV, gripe	Fase I

MDP (muramil di-péptido); MPL (monofosforil lípido A), HAV, HBV, HCV: virus de hepatitis A, B, y C respectivamente Modificado de O'Hagan DT y De Gregorio E. (2009) [7].

1.2. Desarrollo de nuevas vacunas: antígenos y adyuvantes

El desarrollo de nuevas vacunas está relacionado fundamentalmente con la capacidad de identificar antígenos capaces de estimular una respuesta inmune protectora. A su vez, el éxito en el desarrollo de vacunas depende en gran medida del *adyuvante* utilizado en la formulación, que debe asegurar la estabilidad e inmunogenicidad del antígeno [2, 3, 15]. Puede decirse que se buscan dos tipos de efectos al incorporar un adyuvante a una vacuna. El primero está asociado con su *uso clínico* ya que, los adyuvantes permiten la magnitud de la respuesta en poblaciones que presentan mayor susceptibilidad a las infecciones (adultos mayores y niños pequeños), disminuir la dosis del antígeno y reducir el número de dosis vacunales. El segundo se relaciona con la capacidad de estas preparaciones de *modular y dirigir la respuesta* hacia el tipo de inmunidad deseado (ver 1.7) [4, 12, 16]. Por tanto, la selección de un adyuvante adecuado requiere conocer tanto la naturaleza del/los antígeno/s protector/es como la respuesta inmune que se quiere desencadenar (producción de anticuerpos y/o CTLs). No obstante, es frecuente que en las investigaciones tendientes al desarrollo de nuevas vacunas no se conozca en profundidad ninguno de estos aspectos [2, 17].

En general, los adyuvantes combinan dos propiedades: por un lado, *aseguran una liberación lenta del antígeno*, evitando su degradación; por otro lado, *promueven el desarrollo de una respuesta inflamatoria* en el sitio de inoculación a fin de estimular adecuadamente los mecanismos de la inmunidad innata que, en último término, son los responsables del tipo de respuesta adaptativa generada [10, 12, 18].

Los aspectos vinculados con la primera propiedad son esencialmente tecnológicos y se han nutrido de avances en áreas como la tecnología farmacéutica y la fisicoquímica de complejos macromoleculares auto ensamblables. Los aspectos vinculados con la segunda propiedad son esencialmente inmunológicos; en los últimos años, la comprensión de los mecanismos involucrados ha tenido avances importantes tras haberse jerarquizado el papel crucial que desempeña la inmunidad innata en la generación de la respuesta adaptativa [18]. De hecho, el conocimiento de la base molecular de estos mecanismos ha permitido entender “el efecto adyuvante” de numerosas preparaciones (Ver 1.7). No obstante, aún es necesario conocer con mayor profundidad qué receptores de la respuesta innata son activados por los diferentes adyuvantes, y conocer qué señales convierten a las células dendríticas (DC, del inglés, dendritic cell) y monocitos en células presentadoras de antígeno (APC, del inglés, antigen presenting cells) para lograr un diseño racional de estas preparaciones [4, 16]. El desafío es lograr una “mezcla perfecta”, es decir una formulación de diferentes componentes que actúen sinérgicamente y conduzcan a la respuesta inmune deseada [19, 20].

Tanto para uso humano como veterinario, es deseable que los adyuvantes sean: poco tóxicos, rápidamente metabolizados, que promuevan respuestas humoral y/o celular fuertes y duraderas y que sean estables, fáciles de fabricar, de bajo costo, y aplicables a una amplia gama de antígenos y vías de inoculación [4, 21-23].

1.3. Relación entre la inmunidad innata, la adquirida y el adyuvante

Los componentes de la inmunidad innata [24, 25] reconocen específicamente patrones moleculares conservados que son productos esenciales de la fisiología de los microorganismos, a los que se conoce como PAMPs (del inglés, *pathogen associated molecular patterns*) [18], y patrones asociados al daño celular o DAMPs (del inglés, *damage-associated molecular patterns*) [26]. Los PAMPs y DAMPs constituyen “señales de peligro” que, en principio, desencadenan una respuesta innata que puede generar un proceso inflamatorio [25], algunos de cuyos principales mediadores son el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleuquina 12 (IL-12) secretados, entre otras células, por los macrófagos y las células dendríticas [27-29]. Los PAMPs incluyen componentes bacterianos como: lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos, flagelina, ácido micólico, dinucleótidos no metilados (CpG), etc., y componentes de otros microorganismos como virus y levaduras. Tanto los PAMPs como los DAMPs interactúan con receptores de reconocimiento específicos que, colectivamente, se denominan PRRs (del inglés, *pattern recognition receptors*) [25]. Los PRRs se agrupan en familias muy diversas como: lectinas tipo C (del inglés, *C-type lectins*), receptores citosólicos tipo NOD (del inglés, *nucleotide oligomerization domain based-I-like receptors*), receptores inducibles por ácido retinoico, y receptores tipo Toll o TLRs (del inglés, *Toll-like receptors*) que son los más estudiados [17, 27, 29, 30]. La expresión de TLRs en la superficie de las APC como las DC juega un rol fundamental en la iniciación de la respuesta innata [12, 31].

Los PAMPs y los DAMPs inducen la maduración de las DC, lo que se manifiesta por un aumento en la expresión de moléculas tipo II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) y de moléculas de co-estimulación, así como también por la inducción de varias citoquinas que promueven la transformación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos T efectores y de memoria. El conocimiento de los mecanismos moleculares desencadenados por los PAMPs (y DAMPs) ha permitido comprender por qué las vacunas que se fabricaban en el pasado con *microorganismos enteros inactivados* o sus *productos* (toxoides), eran capaces de inducir respuestas inmunológicas potentes y prolongadas, sin que fuera necesaria la adición de adyuvantes [4, 20, 32]. Asimismo, también han permitido comprender por qué los antígenos purificados no son buenos inductores del reclutamiento y activación de las APC, y por qué la incorporación de adyuvantes en la formulación de vacunas con este tipo de antígenos es esencial para lograr una estimulación eficiente de la producción de anticuerpos y/o CTLs. Las vacunas formuladas con ADN, virus atenuados y proteínas recombinantes son ejemplos de preparaciones que requieren adyuvantes para producir respuestas inmunes potentes [3, 5, 33].

1.4. Poblaciones de células T: expresión de citoquinas y estimulación de la producción de anticuerpos

La inducción de una respuesta inmune adaptativa contra antígenos proteicos necesita la activación de las células T (CD4+ y/o CD8+). A su vez, la activación de las células T por las APC requiere por lo menos dos señales. La primera señal (señal 1), está ligada al reconocimiento por parte de la célula T del complejo MHC/péptido en la superficie de la APC. La segunda señal (señal 2) está asociada con la participación de moléculas de co-estimulación (como CD28 en la superficie de la célula T y CD80 y CD86 en la superficie de la APC) y de citoquinas producidas por la APC u otras células presentes en el sitio de activación [34] (a la señal de las citoquinas actualmente se la denomina señal 3).

De acuerdo con el “concepto geográfico” de inducción de inmunidad [35, 36], las DC son activadas a nivel de los órganos linfoides secundarios, en particular en los ganglios, hacia dónde la mayoría de los antígenos son drenados desde su sitio de entrada. Las células T vírgenes recirculan entre los ganglios y es en ellos que ocurre el reconocimiento del complejo MHC-péptido (en la DC) por el receptor de la célula T (TCR, del inglés *T-cell receptor*) y, en presencia de una señal 2, la activación, expansión clonal y diferenciación en células T efectoras y de memoria [37]. La estimulación de las células T a través del TCR en ausencia de señales de co-estimulación lleva a su inactivación funcional y no a su activación. La Figura 1 incluye un esquema simplificado de la activación de células TCD4+, cuyo TCR reconoce complejos MHC II-péptido. Además de la activación de las células T CD4+ y dependiendo del antígeno y/o el

adyuvante se puede inducir también la activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos o CTLs, cuyo TCR reconoce complejos MHC I-péptido [4, 30, 38].

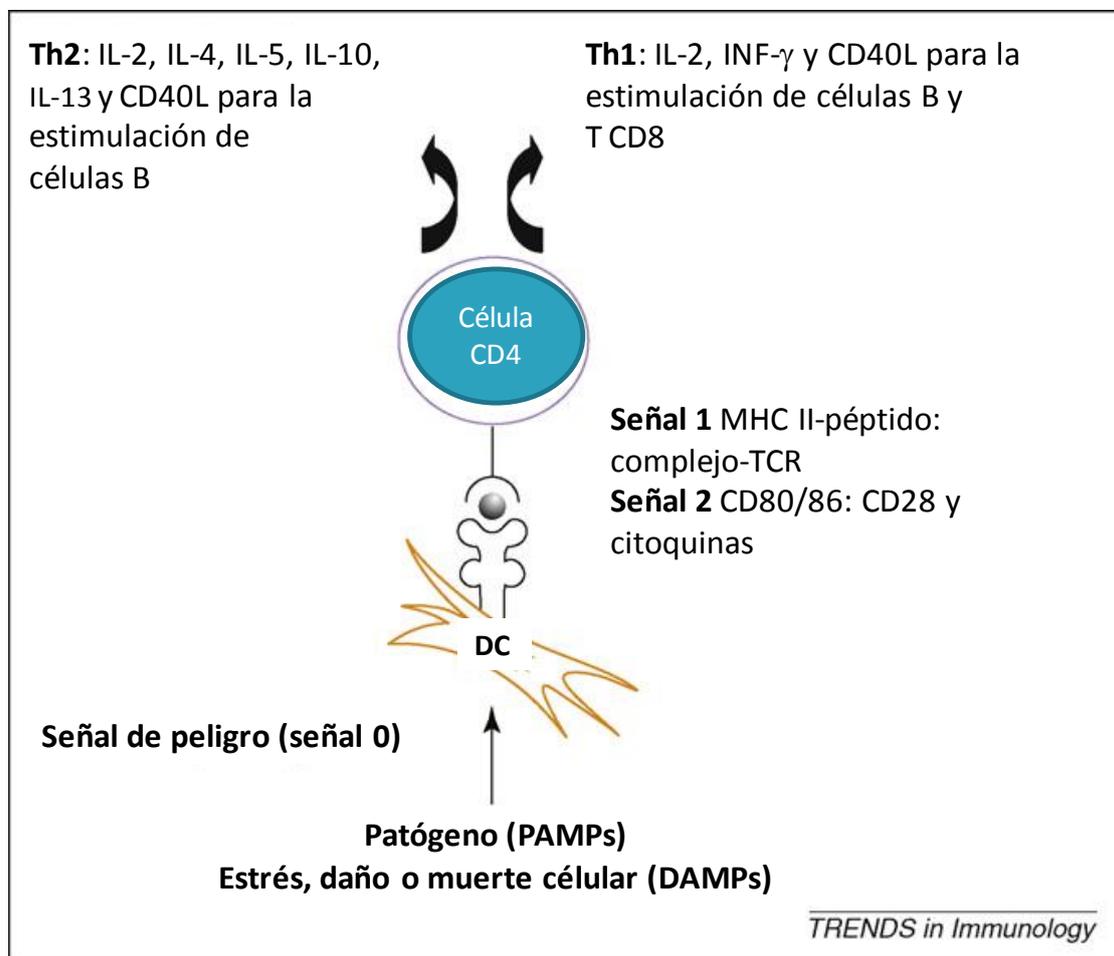


Figura 1. Principales señales de activación de células T CD4+ vírgenes

Las células dendríticas (DC) en reposo presentes en los tejidos reconocen y procesan los antígenos del medio ambiente local mediante diferentes receptores. El encuentro con señales de peligro, PAMPs y/o DAMPs, induce la activación de las DC y su migración a los ganglios linfáticos y posterior maduración caracterizada por un aumento en la presentación de los antígenos peptídicos en complejos con moléculas del MHC I y MHC II (que proveen la señal 1 de activación al interactuar con el complejo TCR) y la expresión de moléculas de coestimulación CD80/CD86 y CD40 (que proveen la señal 2 de activación al interactuar con CD28 y CD40L, respectivamente). Modificado de Reed et al. (2008) [4].

Luego de su activación, las células T CD4+ se diferencian en al menos cuatro linajes, denominados: Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg) que se diferencian por el perfil de

citoquinas que secretan el que, a su vez, determina que posean propiedades biológicas distintas [39, 40]. Las primeras en ser caracterizadas, y por lo tanto las más estudiadas, fueron las poblaciones Th1 y Th2 [41], que modulan la respuesta de las células B y T CD8⁺ [19] (ver Figura 1). La diferenciación de las distintas poblaciones de células T CD4⁺ depende de las señales suministradas por la DC que, a su vez, dependen del tipo de antígeno (o patógeno) que induce su activación y del ambiente en el que ella ocurre. El mismo depende de la vía de entrada del antígeno (o patógeno) y de eventos tempranos, tales como las citoquinas secretadas por otras células de la inmunidad innata presentes en el ambiente dónde las DCs son activadas [40, 42].

También se ha propuesto que la dosis de antígeno (alta o baja) influyen en la polarización son factores que desencadenan la polarización de la respuesta hacia Th1 o Th2 (Figura 2) [40].

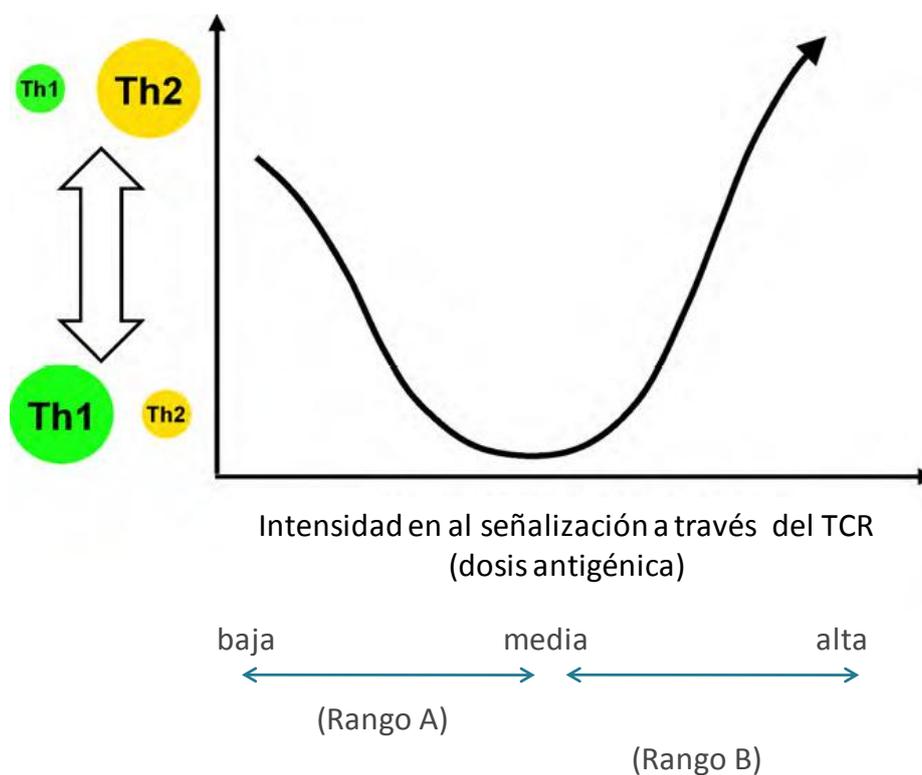


Figura 2. Modelo bifásico de diferenciación celular a Th2

Luego del reconocimiento del antígeno por el TCR, la célula T CD4 + virgen puede comenzar un proceso de diferenciación hacia Th1 o Th2. Esta diferenciación está controlada al menos en parte por la *intensidad* de la señal recibida a través del TCR, de tal manera que tanto dosis bajas (rango A) o altas (rango B) inducen una diferenciación a Th2. Modificado de Nakayama y Yamashita. (2010) [40].

Las células Th1, producen las citoquinas $INF-\gamma$ e IL-2 e inducen la secreción de inmunoglobulinas de isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 por los linfocitos B de ratón [19, 42]. Se conocen como células T CD4+ inflamatorias porque están involucradas en particular, en la activación de macrófagos; además promueven la activación de CTLs [41, 43]. Debido a estas propiedades participan en la erradicación de patógenos intracelulares [42]. Su diferenciación es *dependiente de IL-12* y también *de $INF-\gamma$* , citoquina que esta población secreta (Figura 3).

Las células Th2 se caracterizan por la producción de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e inducen la producción de IgG1, IgE e IgA por los linfocitos B de ratón [19, 34, 44]. En humanos, las citoquinas IL-4 e IL-13 regulan también el cambio de clase a IgE e IgG4 [19, 45, 46]. Además, la respuesta Th2 lleva a la activación de mastocitos y eosinófilos que, sumada a la presencia de altos niveles de IgE circulante, tiene importancia en las alergias. La diferenciación para este linaje, a partir de células T CD4+ vírgenes, *depende*, al igual que la del linaje anterior, *de una de sus citoquinas efectoras la IL-4* [41, 45] (Figura 3), sin embargo, existen evidencias de que la diferenciación a Th2 se puede producir en ausencia de esta citoquina [47].

Las citoquinas producidas por cada una de las poblaciones Th1 y Th2 regulan a la otra población [48, 49]. Así, la producción de INF- γ (por células de Th1) inhibe la proliferación de células Th2, de la misma forma que la producción de IL-10 (por células Th2) inhibe la diferenciación hacia células Th1 [42]. No obstante, esta polarización no es absoluta: es frecuente observar, en el curso de una respuesta, elementos de ambos tipos de respuesta (Th1/Th2) [15, 50].

En las últimas décadas, se han descrito dos nuevos linajes de células T cooperadoras denominadas Th17 y Treg [39, 40]. Las Th17, se caracterizan por la secreción de IL-17 y otras citoquinas pro-inflamatorias (Figura 3). Esta población favorece la eliminación de patógenos extracelulares [51], junto a otros tipos celulares presentes en el sitio de infección que secretan quemoquinas y metaloproteasas que inducen el reclutamiento de neutrófilos a la zona, llevando a la erradicación de los patógenos [18].

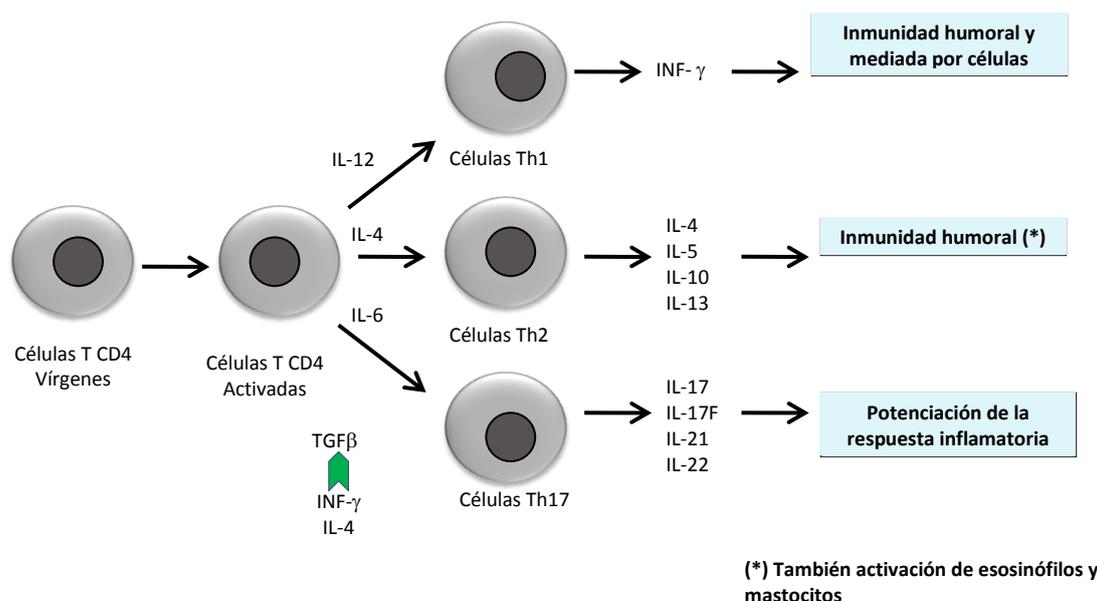


Figura 3. Esquema general de diferenciación de células T cooperadoras.

Las células T CD4 vírgenes luego de su activación por la señalización a través de su TCR y moléculas de coestimulación como CD28 pueden diferenciarse en los linajes de células T cooperadoras efectoras (Th): Th1, Th2 Th17 en presencia de diferentes citoquinas. Estas células producen, a su vez, diferentes citoquinas que median sus funciones efectoras. Modificado de Dong (2010) [39].

A diferencia de las poblaciones Th1 y Th2 que dependen para su diferenciación de sus citoquinas efectoras (INF- γ e IL-4 respectivamente) la población Th17 no depende de la IL-17 sino de IL-6 (citoquina pro-inflamatoria) y de TGF- β (citoquina anti-inflamatoria), dos citoquinas con efectos opuestos actuando juntas [52]. El TGF- β induce también la diferenciación de células Treg con la participación de otras citoquinas como la IL-12 [40]. Existiría por lo tanto un tipo de relación recíproca entre las poblaciones Th17 y Treg en la que otras citoquinas (como la IL-6) cumplirían un rol dictando el balance entre ellas [52].

1.5. Clasificación de adyuvantes

Durante décadas se ha evaluado la actividad adyuvante de componentes naturales (como las saponinas) y sintéticos [53, 54]. En los párrafos siguientes veremos dos de las muchas clasificaciones propuestas para agrupar y/o categorizar a los adyuvantes según su composición, mecanismo de acción, así como también la respuesta que promueven.

1.5.1. Clasificación I: adyuvantes que promueven una liberación controlada de antígeno e inmunoestimuladores

Propone dividir a los adyuvantes en: *inmunoestimuladores* y los que poseen un mecanismo de *liberación controlada del antígeno* [7, 22, 55]. Entre los *inmunoestimuladores*, encontramos agonistas de TLRs y NODs y también citoquinas, quemoquinas, moléculas co-estimuladoras y compuestos naturales como las saponinas [25, 56]. Por otro lado, los que producen una *liberación controlada del antígeno* o adyuvantes particulados, incluyen alúmina, emulsiones, micropartículas, liposomas, e ISCOMS (del inglés, *immunostimulating complexes*), a los que se incorpora o se asocia el antígeno; las saponinas también forman parte de este grupo [57].

1.5.2. Clasificación II: adyuvantes de primera y segunda generación

Se ha reconocido que el sistema de clasificación dicotómico presentado en 1.5.1 (inmunoestimuladores y adyuvantes que promueven una liberación controlada del antígeno) ha sido ampliamente superado por observaciones que ponen de manifiesto

que los adyuvantes que permiten una liberación controlada del antígeno son también inmunoestimuladores. En virtud de esto, O'Hagan y De Gregorio (2009) [7], propusieron una clasificación que considera el *número de adyuvantes utilizados en la formulación*, y distingue: *adyuvantes de primera* (1 adyuvante) y de *segunda generación* (más de un adyuvante).

Los *adyuvantes de primera generación* incluyen la alúmina y las emulsiones de tipo *agua en aceite (W/O)* que han sido los más exitosos de la generación. Ambos basan su acción en la dispersión de partículas a las que se asocian los antígenos y producen un efecto persistente del mismo en el sitio de inyección (efecto depósito) [58]. Las *partículas poliméricas* y los *liposomas* [59] también integran este grupo.

La formulación de *adyuvantes de segunda generación* (también conocidos como sistemas de adyuvantes [60]), fue iniciada en los años 70 con el agregado de otros componentes a los *adyuvantes de primera generación* a fin de aumentar su potencia. El desarrollo de esta generación, fue favorecido por el uso de componentes "sintéticos" que activan el sistema innato como el muramil di-péptido (MDP), que está constituido por componentes solubles en agua de las paredes de micobacterias [61]. En los años 60 y con la finalidad de mejorar la potencia de una vacuna contra la gripe, se había agregado ARN de doble cadena a una emulsión [62]. Es decir que las *formulaciones con 2 o más adyuvantes* [56, 60] se han desarrollado durante más de 40 años. Recientemente, se autorizó su utilización en la formulación de vacunas (Ver Tabla 1 y 2) [7]. En los *sistemas adyuvantes* se busca combinar las propiedades y efectos de los diferentes tipos involucrados en la preparación [1, 55].

Tabla 2. Activación de la repuesta inmune innata y adaptativa por la acción de diferentes adyuvantes

Adyuvante	Componentes activos	Receptores o vías de activación	Principales respuestas inmunes activadas
Adyuvantes con licencia			
Alúmina	Sales de aluminio	Inflamasoma NLRP3 (?)	Ac, Th2 (+ Th1 en humanos)
MF59 y ASO3	Emulsión de escualeno en agua	Inflamación (sin receptores definidos)	Ac, Th1 + Th2
ASO4	MPL más alúmina	TLR4 e inflamasoma (?)	Ac, Th1
Adyuvantes de uso experimental o en desarrollo para uso clínico			
Poly-IC	Derivado sintético de dsRNA	TLR3	Ac, Th1, células T CD8 ⁺
MPL y formulaciones (ASO1, ASO2)	MPL y QS-21	TLR4 (MPL), ? (QS-21)	Ac, Th1
Flagelina	Flagelina de <i>S. typhimurium</i>	TLR5	Ac, Th1+Th2
Imiquimod	Derivados de imidazoquinoles	TLR7, TLR8 o ambos	Ac, Th1, células T CD8 ⁺ (cuando están conjugados)
Oligonucleótidos CpG y formulaciones (IC31, QB10)	DNA unido a fosforotiotato y oligonucleótidos con motivos CpG optimizados	TLR9	Ac, Th1, células T CD8 ⁺ (cuando están conjugados)
CAFO1	Dimicolato de trealosa	Mincle (receptor tipo lectina presente en macrófagos)	Ac, Th1, Th17
ISCOMS and ISCOMATRIX	Saponinas	Mecanismo no definido	Ac, Th1+Th2, células T CD8 ⁺
IFA (y formulación de montanide)	Aceite mineral + surfactante	Mecanismo no definido	Ac, Th1+Th2
CFA	IFA + peptidoglicanos, dimicolato de trealosa	NLR, inflamasoma, mincle, TLR?	Ac, Th1, Th17

Principales respuestas inmunológicas obtenidas en humanos y ratones. Dimicolato de trealosa, es una molécula producida por *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias, CFA (adyuvante completo de Freund), IFA (adyuvante incompleto de Freund) Modificado de Coffman et al. (2010) [12]

1.6. Adyuvantes utilizados en la preparación de vacunas

En esta sección, se discutirán los adyuvantes utilizados en la preparación de vacunas (ver en Tabla 1 las preparaciones ensayadas en humanos) y sus combinaciones (sistemas adyuvantes).

1.6.1. Sales minerales

Identificada originalmente en 1920 [63], la alúmina es el adyuvante más utilizado en la formulación de vacunas para humanos [15, 58, 64-66], pese a lo cual su mecanismo de acción no se conoce completamente [66-68]. Posee propiedades físicas que favorecen la unión de los antígenos mediante interacciones electrostáticas estables, formando suspensiones macroscópicas [34]. Tradicionalmente, se propuso que los antígenos adsorbidos en alúmina son fácilmente internalizados por las APC y que este proceso depende del tamaño del agregado [69](ver 1.7.1.).

La alúmina es de bajo costo, probada seguridad y aplicable a una gran variedad de antígenos. Sus limitaciones están asociadas a su baja capacidad de estimular una inmunidad mediada por células [4, 22], y a que induce la producción de IgE (relacionada con reacciones alérgicas en humanos) [70-73], y la formación de granulomas en el sitio de inyección. Además, su uso como adyuvante presenta algunos inconvenientes ya que las preparaciones de alúmina son heterogéneas y las vacunas pueden volverse inefectivas cuando son congeladas, lo que es un problema en países en vías de desarrollo [4, 74].

1.6.2. Partículas lipídicas

Entre los adyuvantes más exitosos (especialmente en animales) se encuentran los adyuvantes de Freund, conocidos tanto por su potencia como por su toxicidad. Son formulaciones a base de aceite mineral y un tensoactivo que, al ser mezcladas con el antígeno en solución acuosa, forman emulsiones de agua en aceite. El adyuvante completo de Freund (CFA) (a diferencia del incompleto IFA), contiene, una suspensión de micobacterias muertas. A partir de estos adyuvantes, se han desarrollado fórmulas alternativas en base a aceites biodegradables (como el escualeno).

Las emulsiones del tipo W/O son formulaciones constituidas por gotas de agua que contienen el antígeno (fase interna) atrapadas en una fase externa o continua oleosa. Este tipo de emulsión retiene el antígeno en el sitio de inoculación permitiendo su liberación gradual [75]; debido a su alta viscosidad son difíciles de inyectar. En cambio las emulsiones del tipo O/W se caracterizan por su baja viscosidad y buena tolerabilidad; no obstante, inducen respuestas inmunes poco duraderas [76]. Las gotas de aceite de estas emulsiones O/W pueden asociarse mínimamente o no hacerlo con el antígeno localizado en la fase acuosa [77, 78].

El MF59TM, uno de los adyuvantes utilizado en modelos animales con gran éxito y aprobado en más de 20 países para su uso en humanos (Tablas 1 y 2), es una emulsión O/W [12, 79-81]. Ha sido utilizado en Europa en vacunas contra la gripe [81, 82] y en formulaciones que contienen otros antígenos virales (HSV [83], HBV [84] y HIV [85]). En general, este adyuvante presenta pocos efectos secundarios y promueve una respuesta de anticuerpos más potente que la generada por la alúmina.

Los aceites utilizados en estas formulaciones tienen que ser biodegradables y los tenso-activos de calidad probada para su uso en humanos. En general se busca reducir la cantidad de aceite utilizado. En una emulsión W/O esto puede llevar una inversión en las fases dando una emulsión O/W. Estas emulsiones se caracterizan por su reducida viscosidad lo que facilita su preparación y administración en relación a las del tipo W/O [7]. El proceso utilizado en la preparación de las emulsiones modifica la calidad, estabilidad y el tamaño de las partículas de la fase dispersa. Esto tiene un efecto directo sobre la inmunogenicidad del antígeno, de aquí la necesidad de estandarizar el proceso de fabricación de las formulaciones para asegurar su reproducibilidad [86]. Las emulsiones se han utilizado también como sistemas de liberación para adyuvantes inmunoestimuladores como MPL y la saponina QS-21 [22].

1.6.3. Liposomas

Son vesículas fosfolipídicas (partículas con estructura de bicapa fosfolipídica) que han sido evaluadas como sistemas de liberación tanto para antígenos como para adyuvantes y adyuvantes. Poseen un gran espacio interior en donde se pueden incorporar antígenos hidrofílicos. Además, pueden llevar asociados en su membrana antígenos anfifílicos. Sus propiedades físicas son altamente variables (su tamaño puede variar desde 50 nm a pocas micras) y dependen tanto de su composición como también del método de producción [87].

Es relativamente sencillo producir liposomas con el espacio interior vacío; sin embargo, la incorporación eficiente del antígeno puede requerir extensos protocolos de

optimización, por ejemplo para asociarlo a la membrana lipídica [10]. Se considera que tienen un efecto adyuvante de modesto a bajo [88, 89].

1.6.4. Agonistas de TLRs

1.6.4.1. Monofosforil Lípido A (MPL)

El lipopolisacárido (LPS) es un derivado de la pared celular de las bacterias Gram negativa que activa al TLR4. Con fines comerciales generalmente se extrae de *Salmonella minnesota* y de *S. typhimurium* [90, 91]. Con la finalidad de reducir su toxicidad manteniendo sus propiedades inmunomoduladoras se desarrolló el *Monofosforil lípido A* (MPL) que estimula la producción de IL-1, TNF- α por macrófagos y DCs con la subsecuente activación del factor de transcripción NF- κ B [92]. Induce también la producción de IL-12 por macrófagos y DC, que juega un rol protagónico en la polarización de la respuesta hacia Th1 [93, 94].

1.6.4.2. Oligonucleótidos: Dinucleótidos no metilados (CpG)

El DNA bacteriano contiene oligonucleótidos no metilados CpG que difieren de los encontrados en vertebrados (metilados) y son reconocidos a través de TLRs por lo que son buenos activadores de macrófagos y DCs, promoviendo la secreción de citoquinas pro inflamatorias. Al igual que el MPL, los motivos CpG inducen respuestas de tipo Th1 y CTLs [54].

1.6.5. Saponinas

Las saponinas son compuestos glicosídicos de origen natural, constituidos por una porción oligosacáridica (hidrofílica) ligada a través de un grupo hidroxilo, carboxilo o ambos, a una estructura triterpénica o esteroidal denominada aglicona (hidrofóbica) [95, 96], de acuerdo a la cual se las clasifica en: triterpénicas y esteroidales [96-99].

De acuerdo al número de oligosacáridos unidos a la aglicona, las saponinas pueden ser clasificadas como monodesmósidos (un oligosacárido) o bidesmósidos (dos oligosacáridos). En las primeras, el oligosacárido está típicamente unido por un enlace glicosídico al C-3 de la aglicona. Las saponinas bidesmosidias, en general, presentan un segundo oligosacárido unido al C-28 (saponinas triterpénicas) o en el C-26 (saponinas esteroidales) de la aglicona mediante un enlace glicosil-éster.

Los *oligosacáridos* (glicósidos) son *hidrofílicos* e interactúan fuertemente con moléculas del solvente en soluciones acuosas. Por su parte, las *agliconas* son *lipofílicas* y al asociarse con otras agliconas *forman micelas*. Por su naturaleza anfipática, las saponinas son tensoactivas (forman espuma y son emulsionantes) [100]. El carácter anfipático de las saponinas también determina su capacidad de generar micelas de tamaño variable en medio acuoso [101, 102]. Por otro lado, se ha reportado que las saponinas pueden asociarse con esteroides dando lugar a la formación de soluciones coloidales de micelas mixtas o incluso la formación de precipitados [103-105].

Se ha atribuido a las saponinas numerosos efectos biológicos y farmacológicos, entre ellos propiedades inmunomoduladoras, antifúngicas, antitumorales, anti-inflamatorias,

antivirales, hipocolesterolémicas [106, 107]; sabor dulce o salado [108, 109] y efectos tóxicos, en particular propiedades hemolíticas [106, 110, 111], como se resume a continuación.

1.6.5.1. Propiedades inmunomoduladoras

En la década de 1930 se describió que los extractos de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina (saponinas triterpénicas extraídas de la corteza del árbol Chileno Quillay) poseían actividad adyuvante. En los años 70, Dalsgaard, obtuvo una mezcla enriquecida de saponinas a partir de extractos de *Q. saponaria* que denominó *Quil A*, la cual estimulaba tanto la inmunidad humoral como la celular. *Quil A* es comercializada actualmente para uso veterinario, y es empleada por ejemplo en la vacuna contra la fiebre aftosa [112-114]. En humanos, los resultados utilizando *Quil A* como adyuvante vacunal han sido menos satisfactorios que en los modelos animales debido a reacciones locales de dolor, inflamación e induración en el sitio de inoculación. Este hecho ha llevado a que una gran diversidad de saponinas extraídas de otras plantas [14, 115] hayan sido estudiadas y comparadas con las de *Quil A* buscando moléculas capaces de inducir respuestas inmunes potentes pero sin sus efectos secundarios. En la Tabla 3, se incluyen algunos ejemplos de saponinas estudiadas como adyuvantes.

El análisis cromatográfico (HPLC-RP) de *Quil A* muestra que es una mezcla compleja de saponinas. Se han aislado varias fracciones de esta mezcla, en las que predominan distintas saponinas, entre otras, las denominadas: QS-7, QS -17, QS -18 y QS -21 (Figura

4). Estas poseen de 7 a 9 residuos de monosacáridos incluyendo ramnosa, xilosa, galactosa, glucosa y ácido 2,3 D glucurónico distribuidos en dos cadenas oligosacáridicas y una cadena lateral lipofílica [116, 117].

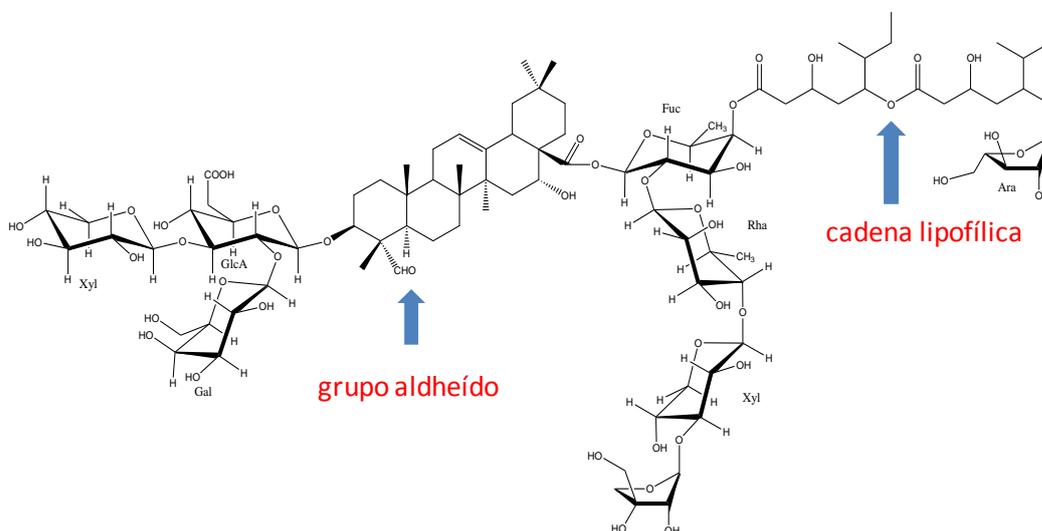


Figura 4 Estructura de la saponina QS-21 aislada de *Quillaja saponaria*

Estudios recientes de la toxicidad de Quil A en ratones muestran que es letal a concentraciones de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ [118]. Si bien las propiedades físicas de las saponinas de Quil A son similares, su toxicidad varía considerablemente, siendo la dosis tóxica en ratones de 25 μg para QS-18 y de 500 μg para QS-21. Por sus propiedades adyuvantes y su baja toxicidad QS-21 ha sido utilizada para la formulación de vacunas contra numerosos patógenos (ver Tabla 1).

Varios estudios han reportado que las saponinas de *Q. saponaria* polarizan la respuesta hacia un perfil tipo Th1 con producción de IL-2 e INF- γ , estimulando la diferenciación de CTLs y la producción de anticuerpos del isotipo IgG2a [119-122]. Por este motivo se han ensayado en numerosos modelos experimentales y con gran variedad de antígenos, con la intención de investigar su eficacia en la generación de

vacunas contra patógenos intracelulares y en el diseño de vacunas terapéuticas contra el cáncer [115] (ver Tabla 3).

Tabla 3. Saponinas con actividad adyuvante aisladas en los últimos años

	Tipo de saponina*	Actividad hemolítica y citotóxica	Características de la respuesta ensayada	Ref.
Saponinas de <i>Achyranthes bidentata</i>	3-MD, 3,28-BD	Poco hemolítica	Promueve la proliferación de esplenocitos y títulos de IgG, IgG1 e IgG2b contra OVA.	[123]
Saponinas de <i>Anemone raddeana</i>	3-MD, 3,28-BD			[124]
Saponinas de <i>Astragalus membranaceus</i>	3-MD, 3,6(25)-BD, 3,6,25-TD	Poco hemolítica	Aumenta la proliferación de esplenocitos y títulos de IgG, IgG1 e IgG2b contra OVA; activa macrófagos.	[125-127]
Saponinas de <i>Chenopodium quinoa</i>	3-MD, 3,28-BD		Adyuvante de mucosas; potencia los títulos de IgG e IgA contra toxina colérica y OVA.	[128]
Escinas	3-MD	Baja toxicidad	Anticuerpos contra OVA (menores títulos que QS-21)	[110]
Saponinas de <i>Glycyrrhiza</i>	3-MD	Poco hemolítica	Promueve la proliferación específica de esplenocitos y títulos de IgG, IgG1 e IgG2b contra OVA; promueve la producción de IL-12 por macrófagos.	[129, 130]
Gypenósidos	3-MD, 3,21-BD	Poco hemolítica	Promueve la proliferación de esplenocitos y títulos de IgG, IgG1 e IgG2b contra OVA; promueve la producción de IL-12 por esplenocitos y de IL-1 por macrófagos.	[131, 132]
Jujubósidos	3-MD	No hemolítica	Aumenta la respuesta de anticuerpos contra OVA	[133]
Kinmonósidos	3,28-BD		Activa células T y B; aumenta títulos de IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b contra OVA.	[134, 135]
Lablabósidos	3,28-BD		Induce la producción de grandes cantidades de IgG1 (poca IgG2a)	[136]
Periandradulcins	3-MD	Poco hemolítica	Aumenta títulos de IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b contra un antígeno de <i>Leishmania donovani</i> (FML).	[137]
Saponinas de <i>Pulcherrima</i> (CP05)	3,28-BD		Induce potente DTH, altos títulos de IgG2b; y menores de IgG, IgG2a e IgG3 en comparación con QS-21.	[138]
Saponinas de <i>Quillaja brasiliensis</i>	3-MD	Baja toxicidad	Aumenta títulos de IgG, IgG1 e IgG2a contra BoHV-1 (virus de herpes bovino tipo 1).	[139]
Saikosaponinas	3-MD	Poco hemolítica	Promueve la proliferación de esplenocitos y títulos de IgG, IgG1 y IgG2b contra OVA; aumenta niveles de IL-1.	[140, 141]
Saponinas de soja	3-MD, 3,22-BD	Poco hemolítica	Mayor respuesta de anticuerpos que QS-21 contra OVA; fundamentalmente IgG1 (poco a IgG2a).	[142, 143]
Taurósidos	3-MD		Fuerte respuesta humoral contra las glicoproteínas rgp 160 y rgp 120 de la envoltura del HIV.	[144]

* Descripción en base al número y la posición de los oligosacáridos. MD: monodesmósido; BM: bisdesmósido; TD: tridesmósido. Modificado de Sun et al. (2009) [115]

1.6.5.2. Efectos tóxicos

Como se ha mencionado, si bien las saponinas de *Quillaja saponaria* muestran gran actividad adyuvante, también presentan efectos tóxicos y reacciones adversas en el sitio de inoculación [118].

Muchas saponinas causan hemólisis *in vitro* [145]. Se ha sugerido que la actividad hemolítica estaría relacionada con la afinidad de la aglicona por el colesterol de las membranas celulares [111, 145]. Debido a su carácter hidrofóbico, se postula que la aglicona puede intercalarse con el colesterol de las membranas; lo que generaría poros de unos 80 Å, que provocarían la lisis celular. El grado de actividad (o afinidad por el colesterol) puede depender de la propia aglicona [146, 147], y/o de los residuos unidos a ésta (oligosacáridos, y/o grupos acilo) [110, 148-151]. Takechi y Tanaka (1995) al analizar un total de 27 saponinas observaron que la actividad hemolítica de las saponinas esteroidales es mayor que la de triterpénicas y que la hemólisis ocurre más rápidamente [146]. Resultados similares se han encontrado analizando otras saponinas esteroidales [137].

Es importante mencionar que las propiedades hemolíticas y de citotoxicidad no siempre coinciden [152]. En este sentido, Gauthier y col. estudiando saponinas triterpénicas concluyeron que existen saponinas hemolíticas con actividad citotóxica, mientras que otras pese a presentar baja o nula actividad hemolítica, sin embargo presentan actividad citotóxica [111]. Por su parte las saponinas de Quil A, y en particular QS-21, son triterpénicas y presentan una intensa actividad hemolítica [110, 116, 118, 153-

155]. Esta actividad hemolítica ha sido relacionada con las cadenas laterales (oligosacáridos) unidas a la aglicona [137] y a los residuos acilos [100]. La presencia del ácido graso (ver Figura 4) podría favorecer la interacción entre la saponina y el colesterol de las membranas promoviendo la hemólisis [156] ya que la remoción del grupo acilo elimina la actividad hemolítica [153].

1.6.6. Formulaciones micelares de saponinas

Se ha demostrado que si las saponinas son administradas formando micelas mixtas complejos con diferentes esteroides se evita que la aglicona interactúe con los esteroides de membrana, evitando la lisis celular [143, 157]. Con esta finalidad, se han utilizado ampliamente saponinas de *Q. saponaria* bajo la forma de complejos micelares, conocidos como ISCOMs y otras estructuras micelares.

Los ISCOMs e ISCOMATRIX son estructuras coloidales o ensamblajes micelares constituidos por Quil A, colesterol, fosfolípidos y antígeno [158] con un tamaño micelar aproximado de 40 nm [87, 159] (Figura 5). La diferencia entre ellos consiste en que los ISCOMs se ensamblan en presencia del antígeno, en tanto que los ISCOMATRIX son partículas a las que se une posteriormente el antígeno

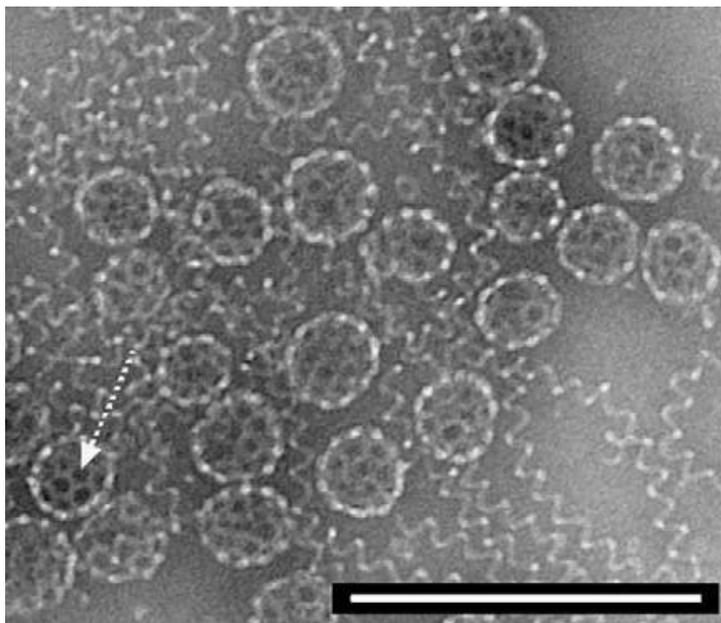


Figura 5. Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de ISCOMs [158]

Existen otras formulaciones en base a saponinas de *Gypsophila* [143], tomatina (glicoalcaloide esteroideal) [160, 161] y *Quillaja brasiliensis* (Quirici y Verza, comunicación personal), las que también forman estructuras con actividad adyuvante. La tomatina, al ser mezclada con colesterol y fosfatidilcolina forma complejos moleculares conocidos como RAM1 que promueven altos títulos de IgG1 e IgG2a [160]. Además de las clásicas partículas tipo ISCOMs, se han obtenido otras estructuras coloidales variando la composición de sus componentes (colesterol, fosfolípidos, saponinas). Por microscopía electrónica se han visualizado distintos tipos de partículas que se diferencian por su forma. Así se han descrito estructuras tipo: hélices, “worm-like” (tipo gusano), “ring-like” (tipo anillo) y lamelares como también otras formas de tamaño variable [158, 162, 163].

A diferencia del colesterol y los fosfolípidos que son “bipolares”, las saponinas de Quil A se caracterizan por poseer tres regiones de diferente polaridad: *hidrofílica-*

hidrofóbica-hidrofílica. La parte hidrofílica está representada por los residuos oligosacarídicos y la hidrofóbica la aglicona de ácido quillájico. Se postula que la formación tipo caja de los ISCOMs e ISCOMATRIX es debida a la estructura de las saponinas de Quil A [164, 165] que se une al colesterol dentro de estas partículas, reduciendo considerablemente su efecto hemolítico, pero manteniéndose su actividad inmunomoduladora. De esta forma, los ISCOMs combinan las propiedades tanto de adyuvantes particulados e inmunoestimuladores y producen una mayor respuesta que sus componentes aislados en solución [166].

El paso crucial en la elaboración de los ISCOMs es la asociación del antígeno a las nanoestructuras. *Técnicamente esta operación es compleja*, y puede requerir introducir *modificaciones en el antígeno*, que pueden llevar a una *disminución en su inmunogenicidad*. Se han utilizado muchas estrategias para lograr un buen anclaje de los antígenos a estas estructuras [158] como la cationización de antígenos para incrementar la interacción electrostática con las partículas que poseen carga neta negativa debido a la presencia del ácido glucurónico en las saponinas y grupos fosfodiéster en los fosfolípidos [167].

Se ha estudiado el uso de ISCOMs e ISCOMATRIX para generar protección contra un gran número de patógenos tanto en modelos animales como en humanos [159]. Entre otros, se ha empleado, contra el virus de influenza H1N1 [168, 169], virus de hepatitis C en primates no humanos [170], de HIV [171, 172], de sarampión [173, 174], el virus respiratorio sincicial [175, 176] y contra clamidias [177, 178]. Además, por su capacidad de generar respuestas de anticuerpos asociados al fenotipo Th1 y de activar

CTLs (ver 1.7.3), se han utilizado en la producción de vacunas terapéuticas contra cáncer, por ejemplo con antígenos del virus del papiloma humano [179, 180] y otros antígenos tumorales [181, 182].

1.7. Mecanismos propuestos para explicar la actividad adyuvante

Como hemos mencionado (ver 1.3) los adyuvantes activan la inmunidad innata desencadenando un proceso inflamatorio que conduce a la activación de las DC. Algunos (MPL, CpG, flagelina) actúan sobre los TLRs activando directamente a las DC, mientras que otros (alúmina, MF59, Quil A) pueden activarlas directa o indirectamente actuando sobre otras células de la inmunidad innata (monocitos, granulocitos, macrófagos) que a su vez contribuyen a la activación de las DC (ver Figura 6)[56, 58].

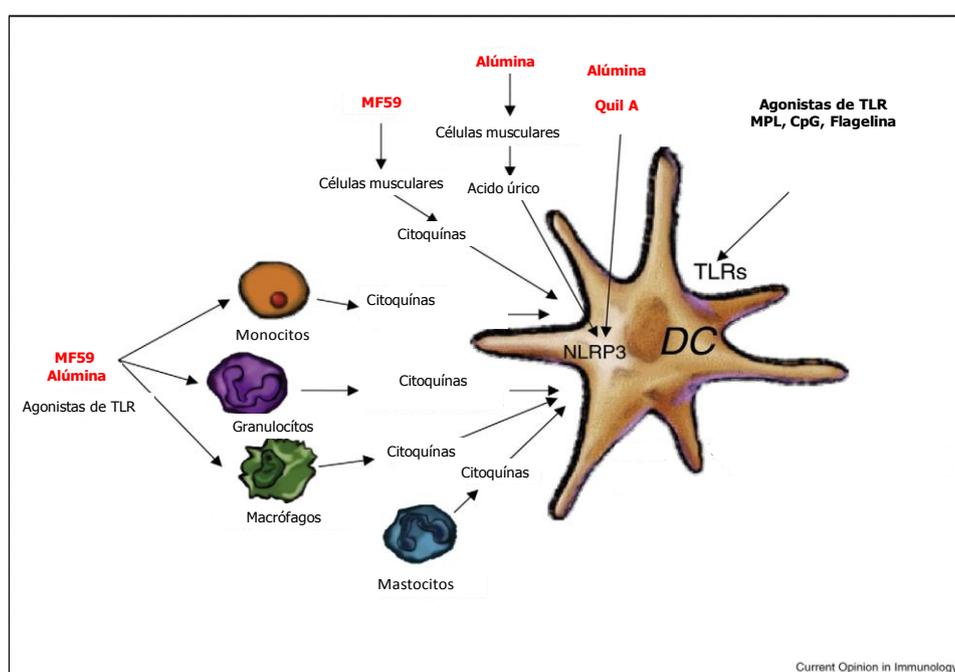


Figura 6. La activación de las DC puede ocurrir por múltiples mecanismos. Los adyuvantes que están en color negro actúan sobre los TLRs activando directamente a las DC. Por otro lado, se propone que los adyuvantes en color rojo pueden activar indirectamente las DCs actuando sobre células accesorias. La Alúmina y el MF59, actúan sobre células como monocitos, macrófagos y granulocitos induciendo inflamación y la secreción por estas células de citoquinas que generan un ambiente inmuno estimulador que eventualmente lleva a la activación de las DC. El MF59 también puede actuar sobre las células musculares en el sitio de inyección estimulando la secreción de citoquinas. Se ha propuesto, que la alúmina causa necrosis llevando a la liberación de ácido úrico que es una señal endógena de peligro y activa el inflamasoma. La Alúmina y la Quil-A activan el inflamasoma a través NLRP3. Modificado de De Gregorio et al. (2009) [56].

La mayoría de los adyuvantes aprobados para uso humano promueven fuertes respuestas de anticuerpos (ver 1.1). En efecto, los utilizados en las vacunas disponibles comercialmente (sales de aluminio y emulsiones) estimulan respuestas del tipo Th2, poco eficaces contra patógenos intracelulares. Por su parte, adyuvantes como el MPL y sus derivados promueven respuestas tipo Th1, pero no estimulan la producción de CTLs (ver Tabla 2). En cambio, se ha reportado que la inmunización de animales utilizando saponinas (*Q. saponaria*, *Crocus sativus*) como adyuvante estimula respuestas tipo Th1 con la producción de CTLs específicos [14, 57] (ver más ejemplos en Tabla 3).

En los párrafos siguientes y para centrarnos en los objetivos de esta tesis, se resumen los mecanismos propuestos para explicar la actividad adyuvante de la alúmina, saponinas (en particular Quil A) y formulaciones micelares en base a saponinas de *Q. saponaria*. Nos referiremos a las saponinas y formulaciones micelares porque son el centro de nuestro estudio y a la alúmina porque fue incluida en nuestros diseños experimentales. Esto se debió, por un lado, a que es un adyuvante de referencia en tanto es el más utilizado en las vacunas para uso humano; y, por otro lado, a que sus efectos son marcadamente diferentes a los de Quil A. Como veremos en los resultados que en esta tesis se presentan, existen saponinas de la flora sudamericana que generan respuestas inmunes parecidas a la alúmina mientras que otras se comportan como las saponinas de Quil A.

1.7.1. Alúmina

Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción de la alúmina, se ha visto que permite la captación de los antígenos por las DC y promueve su activación y la secreción de IL-4, es decir una polarización de la respuesta T hacia un fenotipo Th2 [65, 183].

Tradicionalmente, el efecto adyuvante de la alúmina se explicaba en base a su capacidad para: a) *formar un depósito del antígeno* en el sitio de inoculación, permitiendo su liberación lenta por períodos prolongados, b) *convertir un antígeno soluble en material particulado*, facilitando su endocitosis por las DC, c) *inducir inflamación* por algún mecanismo independiente de TLR favoreciendo tanto el reclutamiento como la activación de las DC [58, 183].

Recientemente, se ha propuesto que la capacidad adyuvante de la alúmina estaría relacionada con la activación de un receptor citoplasmático tipo NOD llamado NLRP3 [56]. La activación NLRP3 lleva a la formación de un complejo proteico denominado *inflammasoma* que induce la expresión de varias citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-18, e IL-33 [66-68, 184]. Este mecanismo no está restringido a la alúmina; se ha demostrado que otros adyuvantes particulados como las saponinas de Quil-A inducen IL-1 β de manera similar [185]. Se cree que la activación del inflammasoma es debida a la generación de DAMPs; en este sentido, se ha propuesto la participación de ácido úrico, ATP [183, 184] y DNA [186] como señales de peligro (ver Figura 6).

1.7.2. Saponinas con especial énfasis en Quil A

Como hemos mencionado, las saponinas de Quil A han sido utilizados desde la década de los 70 [112] y es por eso que sobre ellas existen numerosos estudios tendientes a dilucidar el mecanismo de su actividad adyuvante. Pese a ello, aún no es claro cómo actúan.

Si bien, recientemente, se ha visto que activarían el inflamasoma (ver Figura 6) en los párrafos que siguen, se resume la información disponible acerca de estudios realizados con la finalidad de identificar los elementos estructurales responsables de la actividad adyuvante de las saponinas de Quil A.

1.7.2.1. Participación de los grupos funcionales de la aglicona en la actividad adyuvante

Se ha relacionado la actividad adyuvante de las saponinas de *Q. saponaria* con el grupo *aldehído* presente en la aglicona (ver Figura 4) [53, 117]. En efecto, derivados de QS-21 con modificaciones a nivel del grupo aldehído, no inducen la producción de anticuerpos ni de CTLs [117]. Para explicar el efecto del grupo aldehído en la actividad adyuvante, se ha propuesto que se formaría una base de Schiff entre un grupo amino libre sobre la superficie de una APC y/o una célula T y el aldehído del triterpeno. Se ha sugerido que la formación de este tipo de uniones covalentes entre grupos carbonilos y aminos expresados sobre la APC y la célula T ocurriría habitualmente y actuaría como una señal de coestimulación [187, 188].

La actividad adyuvante también estaría relacionada con el *residuo acilo* unido a la aglicona [189]. QS-17, -18 y -21 (ver Figura 4) están aciladas en el grupo hidroxilo de la posición 4 de la fucosa. Se ha propuesto que el carácter lipofílico de esta cadena lateral se relaciona con su capacidad de estimular la producción de CTLs [53]. Por otro lado, en estudios con saponinas de *Q. saponaria* desaciladas, se verificó además que estas moléculas poseen menos actividad hemolítica y citotóxica [153, 190]

Si bien existe consenso en que los grupos aldehído y acilo presentes en las estructuras de las saponinas de *Q. saponaria* juegan un rol central en su adyuvancia, existen saponinas como las de la soya que carecen de estos grupos funcionales y tienen actividad adyuvante. Recíprocamente, la mayoría de las escinas que poseen residuos acilados no muestran actividad adyuvante. De forma tal que por sí solos, estos grupos no son esenciales para la actividad adyuvante [191].

1.7.2.2. Participación de los residuos oligosacáridicos en la actividad adyuvante

Existen varios estudios que indican que los oligosacáridos de las saponinas serían esenciales para su actividad adyuvante [192]. En particular la actividad de las saponinas de soya aumenta con la cantidad de residuos oligosacáridos presentes en la cadena lateral [191]. Algo similar ocurre en el caso de las saponinas triterpénicas de *Calliandra pulcherrima* [138]. Asimismo, estudios con saponinas de *Panax notoginseng* mostraron que el número de oligosacáridos, el largo y la posición de las cadenas laterales oligosacáridicas así como el enlace de la porción glicosídica afectan la naturaleza de la respuesta inmune inducida [154, 193].

Otra evidencia fue aportada por los estudios de Rönnerberg y colb., que con la intención de disminuir la toxicidad de las saponinas de *Q. saponaria* utilizaron periodato de sodio para oxidar preferentemente los monosacáridos terminales de la molécula (apiosa, galactosa y xilosa). Esto redujo su toxicidad pero también disminuyó su actividad adyuvante [194].

1.7.3. Formulaciones micelares

Se ha demostrado que la inyección de ISCOMs sin antígeno induce una intensa inflamación [195, 196]. Por ser un material particulado, los ISCOMs son endocitadas eficientemente y procesadas por las DC (y también por macrófagos) [197, 198] y por lo tanto, los antígenos pueden ser presentados a las células TCD4+ en complejos con MHC de clase II. Por otro lado, una de las características más relevantes de los ISCOMs, es su capacidad de activar CTLs lo cual requiere que los antígenos sean procesados en el citosol para generar péptidos que posteriormente son presentados en la superficie de las APC en asociación con moléculas MHC de clase I. Inicialmente, se propuso que los ISCOMs se fusionaban con la membrana plasmática de la APC liberando el antígeno al citosol. Recientemente, se ha visto que antígenos que ingresan a la célula por endocitosis también pueden acceder al citosol. A este procesamiento se lo conoce con el nombre de *presentación cruzada*: los antígenos endocitados, que habitualmente son presentados en el contexto del MHC-II, pueden ser presentados por moléculas del MHC-I [199-201]. De esta manera, el antígeno puede ser liberado en el citosol luego de ingresar a la célula tanto por este mecanismo como el propuesto inicialmente. Ambos dependen de las características de las saponinas de *Quillaja spp.*, las cuales tienen la

propiedad de intercalarse con el colesterol presente en las membranas celulares y formar poros a través de los cuales las saponinas y el antígeno ingresarían al citoplasma. [202]. También, se ha reportado que las saponinas actúan directamente sobre DEC-205 (receptor de la familia de lectinas tipo C) en la superficie de las DC promoviendo un mejor procesamiento del antígeno y presentación a las células T [203, 204].

Utilizando varios antígenos se ha visto que los ISCOMs inducen la diferenciación de células T productoras de IL-2 e INF- γ por lo que actualmente puede afirmarse que estas nano-partículas promueven respuestas polarizadas hacia Th1 [122] con producción de IgG2a dependiente del IFN- γ [205]. Sin embargo, es pertinente mencionar también que, en otros estudios con ISCOMS, se ha verificado la producción de IL-4 e IL-5 [206-208], así como también una fuerte respuesta humoral caracterizada por los isotipos IgG1 e IgG2a [209, 210].

1.8. Evaluación experimental de la actividad adyuvante

En esta sección se describen los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* utilizados en este trabajo para evaluar la actividad de diferentes saponinas de *Ilex* spp., *Passiflora alata* y *Q. brasiliensis* y formulaciones de saponinas *Q. saponaria* y lípidos como adyuvantes de vacunación.

1.8.1. Ensayos de citotoxicidad (hemólisis y viabilidad celular)

Como se describió en las secciones anteriores, los adyuvantes de vacunación deben poseer baja o nula toxicidad para poder ser utilizados tanto en medicina veterinaria como humana. Como también se mencionó, las saponinas y fundamentalmente las de *Quillaja saponaria* se caracterizan por presentar toxicidad elevada (en particular, son hemolíticas y citotóxicas) lo que, hasta el momento, ha impedido su uso en vacunas para humanos.

Con la finalidad de testear la toxicidad de las saponinas y sus formulaciones se utilizaron dos ensayos *in vitro*: medida de la actividad hemolítica y medida de la actividad citotóxica sobre células VERO. Mediante la primera técnica, se determinó el poder hemolítico sobre una suspensión de glóbulos rojos de diferentes concentraciones de cada preparación y se cuantificó la hemólisis producida por espectrofotometría. Con la segunda se determinó la viabilidad de células VERO tratadas con diferentes concentraciones de las preparaciones ensayadas, y se caracterizaron las saponinas en función de la concentración a partir de la cual

comienza a observarse muerte celular, utilizando el ensayo colorimétrico de las sales de tetrazolio (MTT).

1.8.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral (IgG total e isotipos de IgG y ensayo de sero-neutralización)

La evaluación de la respuesta humoral mediante la determinación del título de anticuerpos en el suero de los individuos inmunizados ha sido la herramienta más utilizada para probar la eficacia de una vacuna. En este trabajo se inmunizaron ratones y ovejas y se determinaron los títulos de IgG total y de subclases de IgG a fin de tener una indicación acerca de la población de células T cooperadoras implicadas en la respuesta obtenida.

Además, en un estudio realizado con antígenos virales, se evaluó la capacidad de las preparaciones utilizadas como adyuvantes de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, es decir aquellos que se unen a regiones del virus que son reconocidas por los receptores de la célula blanco evitando la entrada del virus a la misma y, por tanto, su efecto citopático.

1.8.3. Evaluación de la respuesta inmune celular (DTH y expresión de citoquinas)

Además de analizar la respuesta humoral inducida por las preparaciones ensayadas utilizamos diferentes técnicas para analizar las respuestas celulares inducidas.

Por un lado, se buscó definir si las preparaciones polarizan la respuesta hacia un fenotipo tipo Th1 o Th2, para ello, se analizó por RT-qPCR la presencia de mRNA de

citoquinas de interés en cultivos de esplenocitos de los ratones inmunizados con las diferentes preparaciones.

Además, se analizó en los ratones inmunizados la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) al antígeno usado en las inmunizaciones. Esta reacción revela la presencia de células T de memoria (CD4+ y CD8+) específicas para el antígeno [38]; por tanto, el ensayo se realiza al menos 2 a 4 semanas post-inmunización [211].

Tradicionalmente, se consideraba que sólo las poblaciones Th1, mediante la inducción de INF- γ , generaban una reacción de DTH positiva. En las últimas décadas, se ha visto en poblaciones de fenotipo Th2 que también serían promotoras de esta respuesta [211, 212]. La activación de las células T promueve un influjo de monocitos y linfocitos al *sitio de inoculación* dando como consecuencia endurecimiento y eritema en la zona del inóculo, evidente 24 a 48 h luego de la inyección.

1.9. Planteamiento del problema

La vacunación como proceso de inmunización activa sigue siendo el mecanismo fundamental para prevenir eficazmente muchas enfermedades infecciosas. Como hemos mencionado, el desarrollo de formulaciones adyuvantes es un componente esencial en el diseño de vacunas, y los adyuvantes actualmente disponibles poseen limitaciones. Por esta razón, el desarrollo de nuevos adyuvantes es en este momento un área de investigación muy activa.

Existe un gran grupo de saponinas pertenecientes a la flora nativa sudamericana, que aún no han sido estudiadas en profundidad desde el punto de vista de su actividad adyuvante. Estas saponinas, de orígenes taxonómicos diversos, podrían desencadenar respuestas inmunes potentes.

Como también hemos mencionado, la asociación de saponinas y esteroides en soluciones acuosas da lugar a la formación de micelas de tamaño y forma variable. Los grupos hidrofóbicos de estos componentes se intercalan formando agrupaciones tipo micelas mixtas que denominaremos *Complejos Supramoleculares de Saponinas (CSS)*.

Los esteroides utilizados en las formulaciones como ISCOMs, liposomas, RAM1, se asocian a la aglicona de las saponinas por medio de enlaces débiles reversibles, inhibiendo su unión al colesterol de la membrana celular, e impidiendo su efecto lítico.

Los CSS, que también son poco hemolíticos, aún no han sido estudiados como adyuvantes. Al igual que las preparaciones de ISCOMs, podrían facilitar la captura del antígeno por las DC e inducir CTL, ya sea por fusión de la micela con la membrana de la APC, o por endocitosis/pinocitosis seguida de presentación cruzada.

La utilización de saponinas con efectos como los de las *Q. saponaria* en los CSS permitiría que actuaran como adyuvantes potentes capaces de inducir respuestas de tipo Th1/Th2 y de CTL.

1.10. Hipótesis

- a- La diversidad de saponinas existente en la flora nativa Sudamericana permite suponer la existencia de saponinas con buena actividad adyuvante y reducidos efectos secundarios aún no estudiados.

- b- Las saponinas y los esteroides en soluciones acuosas forman variados tipos de micelas mixtas mediante fenómenos de auto ensamblaje mediados por interacciones hidrofóbicas. Estas micelas poseen menores efectos secundarios que las saponinas que las constituyen, debido a que su asociación con esteroides inhibe su interacción con la membrana celular.

- c- Los CSS, formados por saponinas y esteroides en solución acuosa, son capaces de formar estructuras micelares por auto ensamblaje que presentan una baja actividad hemolítica.

- d- Los CSS son más efectivos como inductores de la respuesta inmune y son menos tóxicos que las saponinas que los componen, ya que integran la capacidad inmunoestimulante de éstas con una estructura micelar que les otorga un carácter particulado favoreciendo su internalización por las APC.

1.11. Objetivos

- a- Estudiar la actividad hemolítica y citotóxica de saponinas de las especies americanas *Ilex spp.*, *Passiflora alata* y *Quillaja brasiliensis*.
- b- Determinar el potencial adyuvante de saponinas de *Ilex spp.*, *Passiflora alata* y *Quillaja brasiliensis* y caracterizar la respuesta inmune generada.
- c- Optimizar las condiciones de formación de CSS empleando fundamentalmente medidas de actividad hemolítica.
- d- Analizar la cinética de formación de los CSS.
- e- Estudiar la actividad adyuvante de los CSS en animales de laboratorio y de producción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

La solución stock A de TT (3 mg/mL, equivalente a 450 Lf/mL [213]) fue producida en el Departamento de Desarrollo Biotecnológico (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR). Esta fue utilizada para los ensayos de inmunización que se describen en el punto 2.6.1, aquí el TT fue diluido en solución salina a una concentración de 16 µg/mL. La solución stock B de TT empleada para los ensayos de inmunización del punto 2.6.3 fue obtenida del laboratorio Santa Elena. La alúmina fue obtenida de proveedores comerciales: Omega Produtos Quimicos Ltda. (Sao Paulo, Brasil) o Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA). El bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la concanavalina A (Con A), y los esteroides (E) fueron adquiridos en Sigma y el Trizol en Invitrogen (USA).

2.2. Materiales de origen vegetal

Las especies de *Ilex* son originarias de la cuenca de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay donde crecen en estado silvestre (Figura 7), y pertenecen a la familia Aquifoliaceae. Particularmente, *Ilex paraguariensis*, es utilizada con fines comerciales: sus hojas y frutos son procesados para ser consumidos en la infusión conocida como mate [214].



Figure 7 Árbol y flor de *Ilex paraguariensis*
(fotografía , <http://www.henriettesherbal.com>)

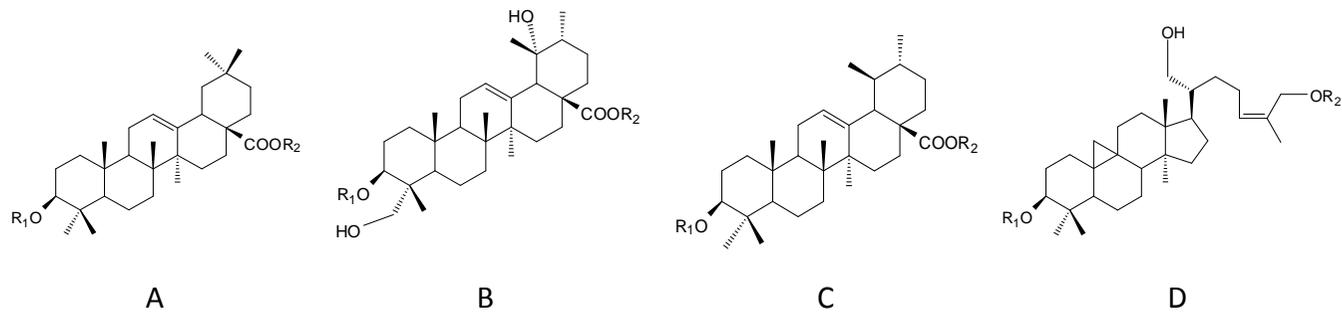
Passiflora alata es una especie nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur y pertenece a la familia Passifloraceae. Se caracteriza por ser una planta de porte mediano (Figura 8), y es utilizada comúnmente con fines ornamentales y en medicina popular [215].



Figura 8. Planta y flor de *Passiflora alata*

Las saponinas de *Ilex spp.* y *Passiflora alata* (Figura 9) ensayadas fueron purificadas y su identidad confirmada utilizando procedimientos descritos previamente. Las saponinas 1 y 2 fueron aisladas de hojas de *Ilex dumosa* [216]; las saponinas 3 y 4 de *I. argentina* [217] e *I. paraguariensis* [218] respectivamente, mientras que la saponina 5 fue aislada de *P. alata* [219].

Para la formulación de los complejos supramoleculares de saponinas (CSS) se empleó una preparación de saponinas de *Q. saponaria* que denominamos SQS, preparada dializando contra agua destilada el producto comercial QP-1000 (Natural Responses, Chile). Quil A fue adquirida a BRENNTAG (Dinamarca).



Especie	Cp	Nombre	Aglicona	R1	R2	Ref
<i>I. dumosa</i>	1		A	α -L-Arap-(1→2)- β -D-Galp	β -D-Glcp	[216]
<i>I. dumosa</i>	2		A	β -D-Glcp-(1→2)- β -D-Galp	β -D-Glcp	[216]
<i>I. argentina</i>	3	Pedunculósido	B	H	β -D-Glcp	[217]
<i>I. paraguariensis</i>	4	Matesaponina 1	C	β -D-Glcp-(1→3)- β -D-Galp	β -D-Glcp	[218]
<i>P. alata</i>	5	Cuadrangulósido	D	β -D-Glcp-(1→6)- β -D-Glcp	β -D-Glcp-(1→6)- β -D-Glcp	[219]

Figura 9. Origen y estructura química de las saponinas de *Ilex* y *Passiflora* spp. ensayadas.

Cp, código del compuesto. Ref, referencia

La especie *Quillaja brasiliensis* (Figura 10) está ampliamente distribuida en Brasil, Argentina y Uruguay. Recientemente, ha sido incluida en la familia Quillajaceae (antiguamente se la clasificaba en la familia de las Rosaceae).



Figura 10 Árbol, fruto y distribución en Uruguay de *Quillaja brasiliensis*. (<http://floradeluruguay.blogspot.com/2010/02/palo-del-jabon.html>)

Se colectaron hojas de *Quillaja brasiliensis* (A. St.-Hil. et Tul.) Mart. en el Parque Batlle (Montevideo, Uruguay) fueron identificadas por el Prof. Eduardo Alonso (Facultad de Química) y se depositó una muestra “voucher” en el herbario (MVFQ 4321) de la Cátedra de Botánica, Facultad de Química. Para la obtención del extracto de hojas y de las saponinas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90U) se utilizó un procedimiento similar al descrito en otros trabajos [139, 220]. Brevemente, las hojas de *Q. brasiliensis* fueron secadas al aire, pulverizadas y las saponinas extraídas con agua (1:10, w/v) bajo agitación constante a temperatura ambiente durante 8 horas. Luego, se filtró y liofilizó

el extracto. El extracto liofilizado fue disuelto en agua y fraccionado utilizando una columna de silica-gel (Lichroprep); eluyendo con un gradiente escalonado de metanol y agua (0-100%). Posteriormente, se analizó la identidad de las fracciones por cromatografía en capa fina; las que contenían saponinas similares se reunieron rotaevaporaron y liofilizaron para conformar la fracción QB-90U. QB-90U se disolvió en solución salina, se filtró a través de una membrana de 0.22 μm y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2.3. Formulación de los CSS

Los CSS son formulaciones micelares binarias constituidos por mezclas de SQS y E. Con la finalidad de obtener CSS con reducida actividad hemolítica, se ensayaron varias relaciones de sus componentes y se modificaron distintas variables fisicoquímicas (temperatura, agitación, pH y tiempo de maduración) durante el proceso de formulación. La relación de esteroles a saponinas en la formulación (E)/(SQS) denominada q , fue ensayada en el rango de 0 a 15.

Las formulaciones fueron almacenadas a 4 °C y su actividad hemolítica fue evaluada según el ensayo que se describe a continuación (ver 2.4.1.1). Una vez comprobada la disminución de la actividad hemolítica, las formulaciones fueron analizadas por microscopía electrónica y posteriormente empleadas para formular la preparación antigénica utilizada para inmunizar ratones y ovejas.

2.4. Ensayos de toxicidad

2.4.1. Ensayos de actividad hemolítica

2.4.1.1. Ensayo de la actividad hemolítica de saponinas de *Ilex* spp. y *Passiflora alata*

Se prepararon GR de oveja por centrifugación (1500 rpm, 5 min) de sangre citratada (obtenida del Bioterio del Instituto de Higiene) y se lavaron tres veces con solución salina estéril. La actividad hemolítica se midió empleando una suspensión de GR al 5% en solución salina. Brevemente, en microplacas de fondo curvo, se colocó un volumen fijo de la suspensión (180 μ L) y del producto a testear en solución salina (20 μ L). Para el ensayo de las saponinas 1-5, se determinó la actividad hemolítica de soluciones en un rango de concentraciones de 30 a 1250 μ g/mL (30, 40, 50, 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 1250 μ g/mL) (ver Tabla 5 en 3.1.1.1). Como controles negativo y positivo se incluyeron, respectivamente, solución salina y SQS en solución salina (100 μ g/mL). Las microplacas se incubaron durante 30 min a 37 °C y posteriormente fueron centrifugadas 5 min a 1500 rpm; se transfirieron alícuotas de los sobrenadantes (75 μ L) a placas de fondo plano y se midió la DO a una longitud de onda de 540 nm [111] en un lector de placas de ELISA.

Se calculó el porcentaje de hemólisis de cada muestra, tomando como 0% y 100% los valores de DO a 540 de la solución salina y SQS respectivamente. Cada determinación fue realizada por triplicado y los resultados de cada saponina se expresaron como concentración hemolítica 50% (CH50), que se calculó empleando una interpolación sigmoidea de los datos.

2.4.1.2. Ensayo de la actividad hemolítica de saponinas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90U)

La actividad hemolítica de las saponinas de la fracción QB-90U fue estudiada utilizando sangre citratada de cobayo (obtenida en el bioterio del Instituto de Pesquisa Desiderio Finamor, Porto Alegre, Brasil), con un ensayo similar al descrito en 2.4.1.1, con algunas diferencias. Se usaron suspensiones de GR al 1% y las saponinas de QB-90U fueron ensayadas en un rango de concentraciones de 500 a 50 µg/mL (500, 250, 230, 200, 180, 160, 150, 130, 110, 100, 70 and 50 µg/mL). Luego de la incubación, las microplacas fueron centrifugadas a 700 g x por 5 min. La lectura se realizó a 415 nm y la CH50 se definió como la concentración mínima de muestra que produjo un 50% de hemólisis tomando como 100 % la hemólisis producida por la solución de SQS.

2.4.1.3. Ensayo de la actividad hemolítica de los CSS

Se midió la actividad hemolítica de formulaciones de CSS preparadas empleando diferentes relaciones de q siguiendo un procedimiento análogo al descrito en 2.4.1.1. Para los ensayos *in vitro*, se utilizaron formulaciones con 60, 120 y 240 µg/mL de saponinas de SQS. Las formulaciones utilizadas para inmunizar ratones contenían 50 y 25 µg/mL, y para los ensayos en ovinos 600, 1200 y 2400 µg/mL.

2.4.2. Ensayo de toxicidad utilizando células VERO

Se utilizó el ensayo colorimétrico del MTT [221] para determinar la viabilidad celular y de esta forma evaluar la citotoxicidad de las saponinas de QB-90U. Brevemente, se cultivaron células VERO en E-MEM suplementado con 10% de FBS (GIBCO) y

antibióticos (penicilina 100 UI/mL; estreptomina 100 µg/mL) (E-MEM/FBS). Posteriormente, se sembraron 4.0×10^4 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂. Luego de 24 h, se retiró cuidadosamente el medio y se agregaron 100 µL/pocillo de QB-90U a diferentes concentraciones (100, 150, 200 y 300 µg/mL en E-MEM/FBS) por triplicado. Se incluyó Quil A como control positivo y solución salina como control negativo. Las placas se incubaron en las condiciones descritas durante 48 h, luego se agregaron 50 µL/pocillo de una solución de MTT (2 mg/mL; Sigma Chemical Co.) y se incubó otras 4 h. Cumplido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de etanol por pocillo, se incubó 15 minutos a 37 °C y se midió la DO a 550 nm en un lector de ELISA. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células viables empleando la relación de la DO de cada muestra problema con respecto a la del control.

2.5. Preparación antigénica de BoHV-5

El virus se replicó en células MDBK (ATCC CCL-22) cultivadas en E-MEM/FBS [222]. Se infectaron mono capas de células crecidas durante toda la noche en frascos de 150 cm² con la cepa A663 de BoHV-5, a una multiplicidad de infección de 0.1 [223, 224]. Cuando se observó un efecto citopático en el 90-100% de las monocapas, los frascos se congelaron a -70 °C; posteriormente, se descongelaron, se centrifugó el medio a baja velocidad y se inactivó la suspensión viral [225]. Se utilizó como antígeno (“BoHV-5”) la suspensión resultante de este proceso, cuyo título previo a la inactivación era $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL.

2.6. Protocolos de inmunización

Los procedimientos experimentales que involucraron animales fueron diseñados según la legislación vigente y siguiendo las normas éticas recomendadas para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Para el diseño de los protocolos, se consideró el número mínimo estadístico de animales necesarios para obtener resultados confiables. Los protocolos empleados en los experimentos realizados en Uruguay (que involucraron ratones y ovejas) fueron previamente estudiados y aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR (CHEA), mientras que los protocolos utilizados en Brasil (que involucraron ratones) fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para los experimentos descritos en las secciones 2.6.1 y 2.6.3.1 se utilizaron ratones adultos (30 g) machos de la cepa Balb/c que fueron adquiridos en DILAVE (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay). Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Higiene y se aclimataron por un período de 30 días previo a los ensayos de inmunización, con un ciclo día/noche de 12/12 horas, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. El agua y el alimento granulado fueron provistos *ad libitum*.

En el experimento descrito en la sección 2.6.2, se utilizaron ratones hembras Rockefeller (5-6 semanas de edad) de la cepa CF-1 obtenidas de la Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre, RS, Brasil). Los animales fueron aclimatados por 72 horas antes de iniciar los ensayos de inmunización. El agua y el alimento granulado fueron provistos *ad libitum*.

En el experimento descrito en la sección 2.6.3.2, se utilizaron ovejas Corriedale de 6 a 8 meses de edad mantenidas a campo en la estación experimental del laboratorio Santa Elena (Florida, Uruguay).

2.6.1. Protocolo para el estudio de saponinas de *Ilex* spp. y *Passiflora alata*

Se inmunizaron grupos de 5 ratones por vía subcutánea (s/c) con TT (100 µL de una solución de 16 µg/mL de proteína en solución salina, equivalente a 0,25 Lf) formulado con las saponinas 1-5 (100 µg/dosis), alúmina (200 µg/dosis) o SQS (10 µg/dosis), en el día 0. Los grupos control recibieron TT solo (0,25 Lf) o solución salina. El refuerzo (“booster”) se realizó en el día 28 del protocolo, con las preparaciones utilizadas en la primo-inmunización. Los animales fueron sangrados en los días: 0, 14, 28 y 131 y los sueros guardados a -20 °C hasta su procesamiento.

2.6.2. Protocolo para el estudio de saponinas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90U)

Los ratones fueron divididos en grupos de 6 animales. Las formulaciones fueron preparadas bajo condiciones asépticas, filtradas a través de una membrana (0.22 µm) y conservadas a 4 °C hasta su utilización. Los animales recibieron dos inmunizaciones por vía s/c; la primera en el día 1 y el refuerzo en el día 14 del protocolo de inmunización. Los animales fueron inmunizados con: 150 µL de BoHV-5 y 50 µL de adyuvante; según el grupo, recibieron: alúmina (200 µg) o Quil A (50 µg) o QB-90U (100 µg). El grupo control fue inmunizado con antígeno solo. Los animales fueron sangrados en los días 1, 14 y 28 y los sueros congelados a -20 °C hasta su procesamiento.

2.6.3. Protocolo para el estudio de CSS

2.6.3.1 Inmunización de ratones

Los ratones (grupos de 5 animales) recibieron dos inmunizaciones de TT por vía s/c: la primera, en el día 1 y la segunda en el día 45. La primo-inmunización se realizó con 1.6 µg (100 µL) de TT salvo en el caso de los animales del grupo CSS50 que fueron inmunizados con 3.2 µg. Los diferentes grupos recibieron como adyuvante: SQS (25 µg) o ADYUVAC50 (Laboratorios Santa Elena) o CSS25 (CSS conteniendo 25 µg de SQS) o CSS50 (CSS conteniendo 50 µg de SQS) en un volumen final de 100 µL. El grupo control recibió sólo TT. La segunda dosis (día 45) fue formulada con la mitad de antígeno (0.8 µg) y de adyuvante, con la excepción del grupo de ADYUVAC50 en el que el antígeno se redujo a la mitad (0.8 µg), pero el adyuvante se mantuvo. Los animales fueron sangrados en los días 1, 45, 66, 107, 147 y 167 luego de la primera inmunización y los sueros congelados a -20 °C hasta su procesamiento.

2.6.3.2 Inmunización de ovejas

Las ovejas fueron divididas en 5 grupos de 10 animales; recibieron dos inmunizaciones por vía s/c, en los días 1 y 28. Fueron inmunizadas con TT (5 Lf, [213]) formulado con ADYUVAC50 o con CSS600 o CSS1200 o CSS2400 (en cada caso, el número indica el contenido en µg/mL de SQS en la formulación del CSS). El grupo control recibió sólo TT en solución salina. Los animales fueron sangrados en los días 1, 28, 76 y 195 luego de la primera inmunización y los sueros congelados a -20 °C hasta su procesamiento.

2.7. Determinación de anticuerpos específicos

2.7.1. Anticuerpos anti-TT

Los títulos de IgG total e isotipos de IgG contra TT en sueros de ratones y ovejas fueron evaluados por ELISA. Brevemente, se sensibilizaron las placas (Greiner Bio-One) con TT (100 µg/mL) en PBS (100 µL/pocillo) toda la noche a 4 °C. Después de la sensibilización, se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0.05 % (v/v) de Tween 20 (PBS/T) y se bloquearon incubando 1 hora a 37 °C con una solución al 5% (w/v) de leche bovina en polvo en PBS (200 µL/pocillo). Luego, se lavaron nuevamente como se describió y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con los sueros diluidos en PBS/T conteniendo 0.1% de BSA (w/v) (PBS/T/BSA), sembrados por duplicado (100 µL/pocillo). Luego de lavar otra vez, se incubaron 1 hora a 37 °C. con diluciones apropiadas en PBS/T/BSA del conjugado a peroxidasa correspondiente: anti-IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, USA), IgG1 (Caltag Laboratories, USA), IgG2a o IgG2b (Zymed Laboratories, USA) de ratón (100 µL/pocillo). En el caso de los sueros de ovejas, este paso se realizó en dos etapas: se incubó primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG1 o IgG2 de oveja (obtenidos en la Universidad de Sydney, [226]) durante toda la noche a 4 °C, luego se lavó de la forma habitual y se agregó un conjugado anti ratón como en el ensayo con sueros de ratón. Finalmente, las placas se lavaron y se agregó (100 µL/pocillo) de una solución conteniendo sustrato y cromógeno (H₂O₂ + ABTS); 15 minutos después se leyó la DO a 405 nm. En cada placa, se incluyeron diluciones seriadas de un pool de sueros (del experimento correspondiente) para la

confección de una curva de calibración, que fue utilizada para expresar el título de anticuerpos en unidades arbitrarias/mL (UA/mL).

2.7.2. Anticuerpos anti-BoHV-5

Los títulos de IgG e isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) contra BoHV-5 fueron determinados por ELISA, utilizando un protocolo análogo al que se describió en 2.7.1, salvo en lo que se indica a continuación. Las placas se sensibilizaron con una dilución 1:100 (v/v) de BoHV-5 (el antígeno utilizado en la inmunización, ver 2.5) en buffer bicarbonato (pH 9.6); luego, se lavaron y se bloquearon con BSA (1% en PBS) durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se incubaron con una dilución apropiada de cada suero de ratón (v/v en PBS-T-BSA) se lavaron y se incubaron con el correspondiente conjugado: anti-IgG (Sigma Chemical Co.) (1:10000 en PBS-T), IgG1 (Caltag Laboratories) (1:5000 en PBS-T), IgG2a, IgG2b ó IgG3 (Zymed Laboratories) (1:5000 en PBS-T) de ratón. Finalmente, se agregó cromógeno OPD (*ortho*-fenilenediamina, Sigma Chemical Co.) y H₂O₂ como sustrato. La placa se incubó a 15 min. a 37 °C. y se detuvo la reacción con el agregado de HCl 1 N. Se midió la DO a 492 nm. En cada placa se incluyeron diluciones seriadas de un pool de sueros para la confección de una curva de calibración como se describió en 2.7.1. En el caso de los títulos de IgG3, los de los problemas fueron mucho más bajos que los del pool de sueros con el que se confeccionó la curva estándar; por este motivo, se los expresó con el valor de la DO. Para cuantificar esta subclase, los sueros fueron diluidos 1/100.

2.8. Ensayo de Sero-Neutralización (SN)

Se utilizaron 100 dosis infectivas medias de cultivo (TCID₅₀, cantidad capaz de producir cambios patológicos en el 50% de las células de un cultivo) de la cepa A663 de BoHV-5. En placas de 96 pocillos, se mezcló la suspensión viral con diluciones de los sueros de los ratones inmunizados (1/5 hasta 1/640) y se incubó 24 horas a 37 °C, siguiendo un protocolo descrito previamente [227]. Cumplido el tiempo para la neutralización, se agregaron 4×10^4 células MDBK por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂ por 120 horas, luego de lo cual se analizaron para detectar la presencia o ausencia de efecto citopático.

2.9. Reacción de Hipersensibilidad retardada (DTH)

2.9.1. Respuesta de DTH luego de la inmunización con TT

El ensayo de DTH fue realizado en tres ratones de cada grupo, 146 días después de la primo-inmunización. Los animales fueron inyectados por vía s/c en la almohadilla plantar posterior con TT (10 µL de una solución 1.6 µg/mL en PBS). Luego de 24 horas, se midió la hinchazón del plantar posterior con un calibre. Para evitar molestias innecesarias a los animales, la hinchazón del grupo control (producida por la inoculación de solución salina) fue considerada como control del procedimiento de punción (hinchazón basal). Se tomó como respuesta de DTH contra TT de cada animal a la hinchazón del plantar posterior menos la media de la hinchazón basal.

2.9.2. Respuesta de DTH luego de la inmunización con BoHV-5

La respuesta de DTH fue ensayada en tres animales de cada grupo 28 días después de la primo-inmunización. Los animales fueron inyectados (s/c) en la almohadilla plantar posterior con BoHV-5 (10 μ L). Se midió con un calibre la hinchazón de la almohadilla plantar 24 horas después y la DTH se calculó siguiendo el procedimiento descrito en 2.9.1.

2.10. Ensayo de proliferación de esplenocitos

Los bazos fueron colectados en RPMI 1640 en condiciones asépticas, 120 días después de la segunda inmunización, y disociados mecánicamente empleando pinzas y tijeras con la finalidad de obtener una suspensión homogénea. Los eritrocitos presentes en la suspensión fueron lisados con cloruro de amonio estéril (0.8%, w/v); las células se separaron por centrifugación (380 x g 4 °C por 10 min), se lavaron tres veces con RPMI y se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 2-mercaptoetanol 0.05 mM, 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, 2 mM de L-glutamina y 10% de SBF (RPMI completo) Luego se contaron utilizando azul de tripán, y se comprobó que la viabilidad excedía el 95%. Para el ensayo de proliferación, se sembraron 100 μ L de una suspensión de 2.5×10^5 células/mL en medio completo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Se incluyeron *conavalina A* (Con A, concentración final 5 μ g/mL) como control de estimulación, *BoHV-5* inactivado como control de estimulación específica, y *medio*. Cada muestra fue incubada por triplicado en un volumen final de 200 μ L/pocillo, a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de 44 horas, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo se añadió 50 μ L de MTT (2mg/mL), y las placas se

incubaron nuevamente por 4 horas. Finalmente, se centrifugaron (1400 x *g* por 5 min) y se retiró el MTT no transformado. Los cristales formados en el interior de las células por la metabolización del MTT se disolvieron en dimetil sulfoxido (192 μ L DMSO; 8 μ L HCl 1N por pocillo), y luego de 15 minutos se midió la DO en un lector de ELISA a 550 nm. El índice de estimulación (SI) fue calculado según: $SI = DO \text{ del cultivo estimulado} / DO \text{ del cultivo no estimulado}$.

2.11. Evaluación de la expresión de genes de citoquinas

Los esplenocitos, preparados como se describe en 2.10, se sembraron en micro-tubos a una concentración de 5×10^6 células/mL en 100 μ L de RPMI completo. Trabajando por triplicado, se estimularon las células con Con A (concentración final de 5 μ g/mL) o con BoHV-5 inactivado en RPMI hasta un volumen final de 200 μ L. Los tubos fueron incubados a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO₂; luego de 16 horas se agregó a cada tubo 0.5 mL de Trizol (Invitrogen) y se los almacenó a -80 °C hasta su procesamiento. El ARN se extrajo de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se controló por medidas a 260/280 nm (Nanodrop). Una alícuota de RNA total (1 μ g) fue tratada con DNAsa-I (Invitrogen); inmediatamente, se realizó la síntesis del ADNc con “primers” aleatorios (Invitrogen) y transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). El ensayo de qPCR se realizó utilizando un QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen) en un Rotor-Gene 6000 (Corbett). Los primers cuya secuencia se describe en la Tabla 4, fueron utilizados a una concentración final de 0.9 μ M. Las condiciones de ciclado fueron de 15 min a 95 °C seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por un minuto. Los niveles de expresión de los genes de interés fueron normalizados usando

como gen de expresión constitutiva el de la β -actina. La cantidad relativa de ARNm en cada muestra fue calculada usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [228] donde $\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{\beta act}$, y expresada como niveles relativos de ARNm en el grupo inmunizado comparado con el grupo control.

Tabla 4. Secuencia de los “primers” utilizados para la RT-qPCR.

Gen nombre	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Prod. tamaño
β -actin	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG	68
IL-2	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	CTTTCAATTCTGTGGCCTGCTTGGG	92
INF γ	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	CCGCTTCCTGAGGCTGGAT	143
IL-4	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	95
IL-5	AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT	TCCAATGCATAGCTGGTGATT	117
IL-13	GGAGCTGAGCAACATCACACA	GGTCCTGTAGATGGCATTGCA	142
IL-10	CATTTGAATCCCTGGGTGAGA	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	101

2.12. Técnica de microscopía eléctrica de transmisión (TEM) por tinción negativa

Para visualizar tanto la forma como el tamaño de los CSS, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) por tinción negativa. Para la preparación de las muestras se colocó una gota de la suspensión de CSS sobre una grilla de Formvar-carbon y se dejó reposar por 60 s. Luego, se retiró el exceso de fluido con papel de filtro evitando cualquier contacto con los dedos y la grilla. A continuación se depositó una gota de ácido fosfotungstico al 2% y pH 7,2 sobre la misma grilla, dejándola actuar por 60 s, luego de lo cual se secó el exceso de líquido. Para la TEM se empleó un equipo de microscopía electrónica Jeol (JEM 10.10) (Facultad de Ciencias-UdelaR).

2.13. Análisis estadísticos

Los datos fueron expresados en base a la media \pm el error estándar (S.E.) o el desvío estándar (S.D.). Para examinar el nivel de significación estadística se utilizó el test t de Student's. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados de significación estadística.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Saponinas de la flora nativa como adyuvantes de vacunación

3.1.1. Saponinas purificadas de *Ilex* spp. y *Passiflora alata*

3.1.1.1. Las saponinas de *Ilex* spp y *Passiflora alata* son poco hemolíticas

En la Tabla 5, se muestra la actividad hemolítica de las saponinas de *Ilex* spp. (1-4) y de *P. alata* (5) junto con la de SQS como control positivo. Se observa que, con excepción de la saponina 4 que produjo una leve hemólisis (6.0 %) a la mayor concentración ensayada (1250 µg/mL), las saponinas no mostraron actividad hemolítica detectable en el rango de concentraciones analizado. Estos resultados contrastan fuertemente con la actividad hemolítica reportada para SQS [106, 116] (y confirmada en este estudio). Es importante resaltar que la concentración de SQS que produce un 100% de hemólisis (100 µg/mL) es la que se usó en la inmunización. En cambio, salvo por la saponina 4 que resultó levemente hemolítica, las saponinas 1-5 no presentan actividad hemolítica a la concentración usada en la inmunización (1000 µg/mL), por lo que es de esperar que generen menores efectos secundarios (tóxicos) que SQS al ser administradas por vía s/c.

Tabla 5. Actividad hemolítica de saponinas de *Ilex* y *Passiflora* spp. 1 – 5.

Los valores corresponden a la media \pm SD (n=3). Solución salina y SQS fueron tomados como referencia de 0% y 100% de actividad, respectivamente. SQS: Mezcla de saponinas de *Q. saponaria*. A_{540} : absorbancia a 540 nm. ND: no detectado. * Se consideró un peso molecular promedio de 1600 Da.

Muestra (ver Figura 9)	Concentración		A_{540}	Actividad hemolítica (%)
	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)		
Sol. salina	--		0.074 \pm 0.01	0
SQS*	100		1.845 \pm 0.01	100
Saponina 1	500	0.55	0.016 \pm 0.01	ND
	1000	1.09	0.019 \pm 0.01	ND
	1250	1.37	0.071 \pm 0.04	ND
Saponina 2	500	0.53	0.028 \pm 0.01	ND
	1000	1.06	0.024 \pm 0.01	ND
	1250	1.33	0.021 \pm 0.01	ND
Saponina 3	500	0.77	0.019 \pm 0.01	ND
	1000	1.54	0.015 \pm 0.00	ND
	1250	1.92	0.020 \pm 0.01	ND
Saponina 4	500	0.53	0.073 \pm 0.01	ND
	1000	1.06	0.148 \pm 0.03	4.0 \pm 1.3
	1250	1.33	0.187 \pm 0.04	6.0 \pm 2.3
Saponina 5	500	0.44	<0.010	ND
	1000	0.88	<0.010	ND
	1250	1.09	<0.010	ND

3.1.1.2. Algunas saponinas de *Ilex* spp. y *Passiflora alata* poseen una actividad adyuvante similar a la de la alúmina.

Inicialmente, se analizó la evolución de los títulos de IgG contra TT en el suero de ratones inmunizados en los días 0 y 28 del protocolo empleando las saponinas 1-5 como adyuvante (Figura 11). Se observa que, a los 14 y 28 días post-inmunización, los animales pertenecientes a los grupos controles (TT con SQS o alúmina) mostraron títulos significativamente superiores a los de los grupos que fueron inmunizados con TT sin adyuvante o con las saponinas 1-5 ($p < 0.05$).

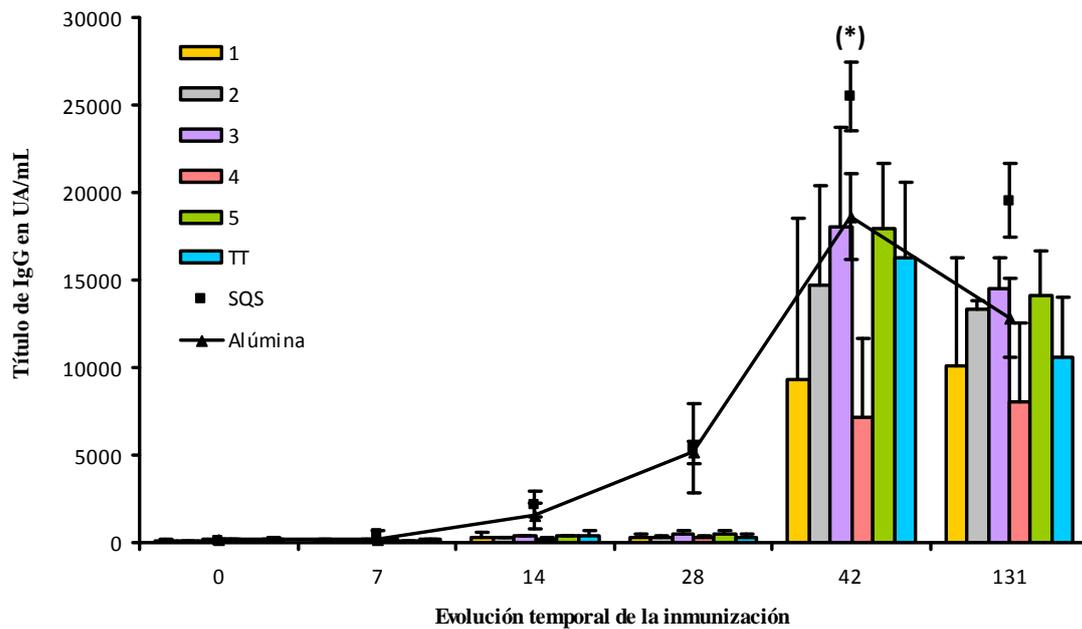


Figura 11. Evolución de los títulos de IgG contra TT.

Los ratones fueron inmunizados en los días 0 y 28 con TT sólo o adyuvantizado con las saponinas 1-5, alúmina o SQS. Los animales fueron sangrados en los días 0, 7, 14, 28, 42 y 131. Los datos están representados como la media \pm SD (n=5). (*) Indica que el título de IgG en los ratones inmunizados con TT y SQS fue > 30000 .

En el día 42 (dos semanas luego de la segunda inmunización), se detectaron niveles elevados de IgG anti-TT en todos los animales, siendo los inmunizados con SQS y TT los que mostraron los niveles más altos ($p < 0.05$). Por su parte, los grupos inmunizados con TT y las saponinas 1, 2, 3 y 5 no difirieron significativamente del grupo inmunizado con alúmina ($p > 0.05$), mientras que los títulos del grupo inmunizado con la saponina 4 fueron significativamente menores que los del grupo inmunizado con alúmina ($p < 0.05$).

En el día 131, los títulos de IgG permanecieron elevados en todos los grupos: los animales inmunizados con las saponinas 1-5 no mostraron diferencias significativas

entre ellos ni tampoco con los grupos inmunizados con alúmina y con TT sin adyuvante, en tanto que el grupo inmunizado con SQS siguió mostrando los títulos más altos ($p < 0.05$). Es decir que, luego de la segunda inmunización, los niveles de IgG de los animales inmunizados con las saponinas 1-5 fueron equivalentes a los del grupo inmunizado con alúmina o con TT solo. Los altos títulos alcanzados utilizando TT sin adyuvante son compatibles con la información bibliográfica, ya que es conocido que este toxoide es un buen inmunógeno [229].

Luego, se procedió a analizar si existían diferencias entre los grupos en las sub-clases de IgG anti-TT. En la Figura 12, se muestran los niveles de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-TT en los días 42 y 131 del protocolo de inmunización. En todos los grupos, los títulos observados en el día 42 se mantuvieron al día 131. Los animales inmunizados con las saponinas 1-5 mostraron un perfil de anticuerpos con predominio de IgG1 y escasa producción de IgG2a ($IgG1 > IgG2b >> IgG2a$), similar al observado para los animales inmunizados con TT sin adyuvante o con alúmina [229].

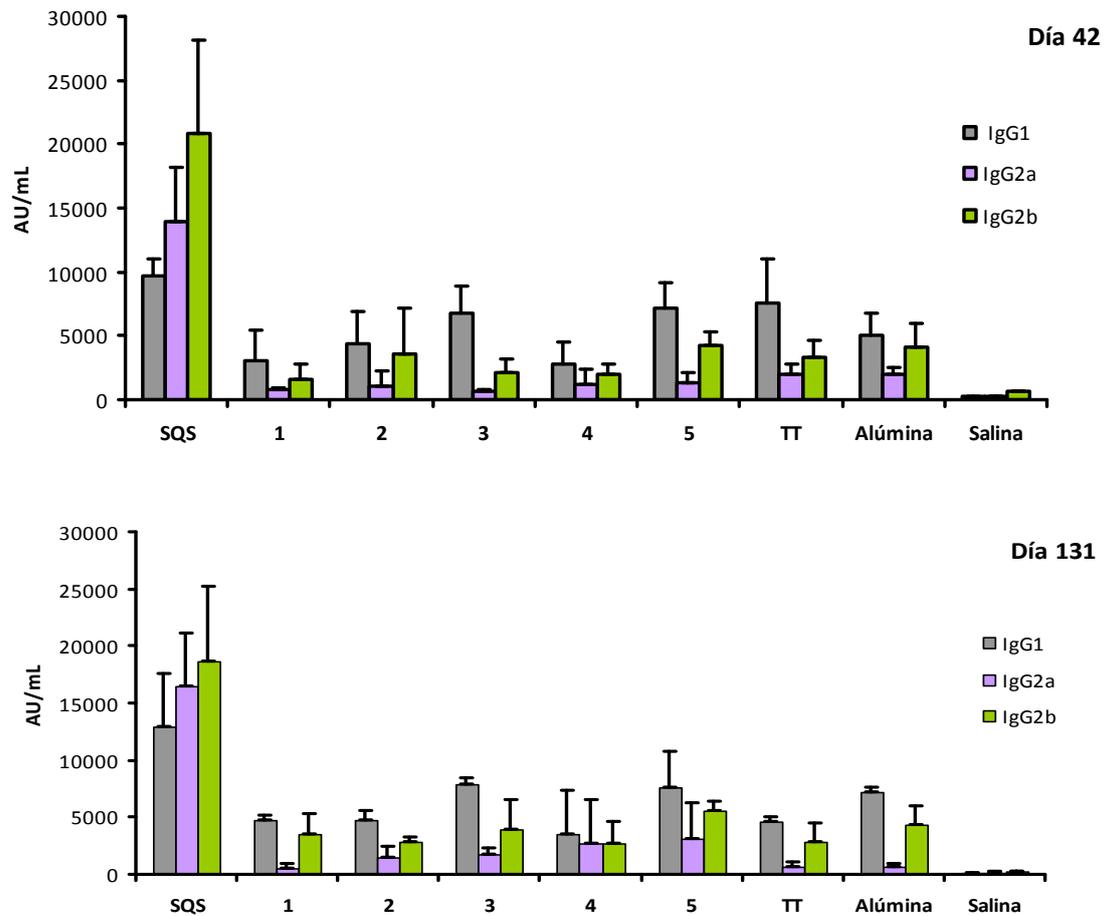


Figura 12. Títulos de anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b anti-TT. Los ratones fueron inmunizados en los días 0 y 28 con TT sin adyuvante o con TT y las saponinas 1-5, alúmina o SQS. Los datos se expresan como la media \pm SD (n=5).

Los animales inmunizados con SQS presentaron altos títulos de todos los isotipos analizados y un perfil diferente entre las sub-clases (IgG2b>IgG2a>IgG1). Tomando en cuenta los resultados de IgG total y el perfil de sub-clases, se puede afirmar que, en las condiciones de nuestro ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados con TT ya sea con las saponinas 1-5, alúmina o sin adyuvante.

Finalmente, se analizó la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) a TT, como una primera aproximación al estudio de la inducción de inmunidad celular (Figura 13).

En la figura se observa que se obtuvo una respuesta significativa en todos los animales inmunizados, excepto en los que recibieron TT sin adyuvante o TT con la saponina 2. Más aún, los grupos inmunizados con TT y las saponinas 3 y 5, así como también con SQS y alúmina no mostraron diferencias entre sí ($p > 0.05$), indicando que estas saponinas potencian la respuesta mediada por células frente al TT.

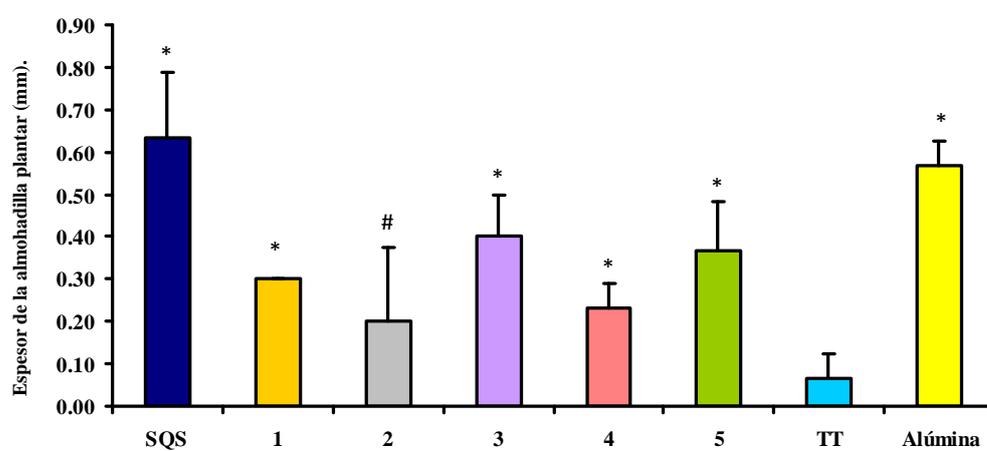


Figura 13. Respuesta de DTH en los ratones inmunizados con TT.

El ensayo fue llevado a cabo en el día 146 del protocolo de inmunización. Los datos corresponden a la media \pm SD ($n=3$). (*) Diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo control. (#) En dos de los tres ratones analizados se obtuvo un valor más alto que la media del grupo inmunizado con TT sin adyuvante.

3.1.1.3. Comentarios finales

En términos generales, nuestros resultados muestran que las saponinas de *Ilex spp.* y *P. alata* ensayadas inducen una respuesta inmune similar a la que promueve la alúmina, incluida, en algunos casos, la generación de una reacción de DTH positiva (saponinas 3 y 5). Por otro lado, estos compuestos carecen de actividad hemolítica, aún a altas concentraciones, son solubles en agua y, por tanto, forman soluciones acuosas homogéneas cuando son mezclados con el antígeno. Estas características

pueden representar ventajas frente a la alúmina, cuyas formulaciones son suspensiones que pueden inactivarse por congelación. En estudios futuros, se debería profundizar en las propiedades de las saponinas 3 y 5, a fin de confirmar su potencial capacidad adyuvante como alternativas a la alúmina.

3.1.2. Saponinas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90U)

3.1.2.1. Las saponinas de QB-90U son significativamente menos tóxicas que las saponinas de Quil A

La actividad hemolítica de la fracción QB-90U de saponinas de *Q. brasiliensis* se muestra en la Figura 14a. A una concentración de 200 µg/mL, QB-90U produjo un 93.8% de hemólisis, en tanto que a 100 µg/mL, la concentración utilizada en la inmunización, el porcentaje de hemólisis fue de solo 14.4%. Es de destacar que a esa concentración Quil A produce un 100 % de hemólisis, en tanto que a 50 µg/mL, la concentración usada en la inmunización, produce 55% de hemólisis. La menor actividad hemolítica de QB-90U respecto a Quil A queda evidenciada por valores de CH₅₀, los cuales son de 132.2±3.1 µg/mL y 52.1±1.8 µg/mL, respectivamente. En varios estudios se ha reportado la elevada actividad hemolítica y toxicidad de las saponinas QS-21 y Quil A de *Q. saponaria* [116, 118, 155], por lo que es importante destacar la relativamente baja actividad hemolítica de QB-90U, obtenida de una especie del mismo género.

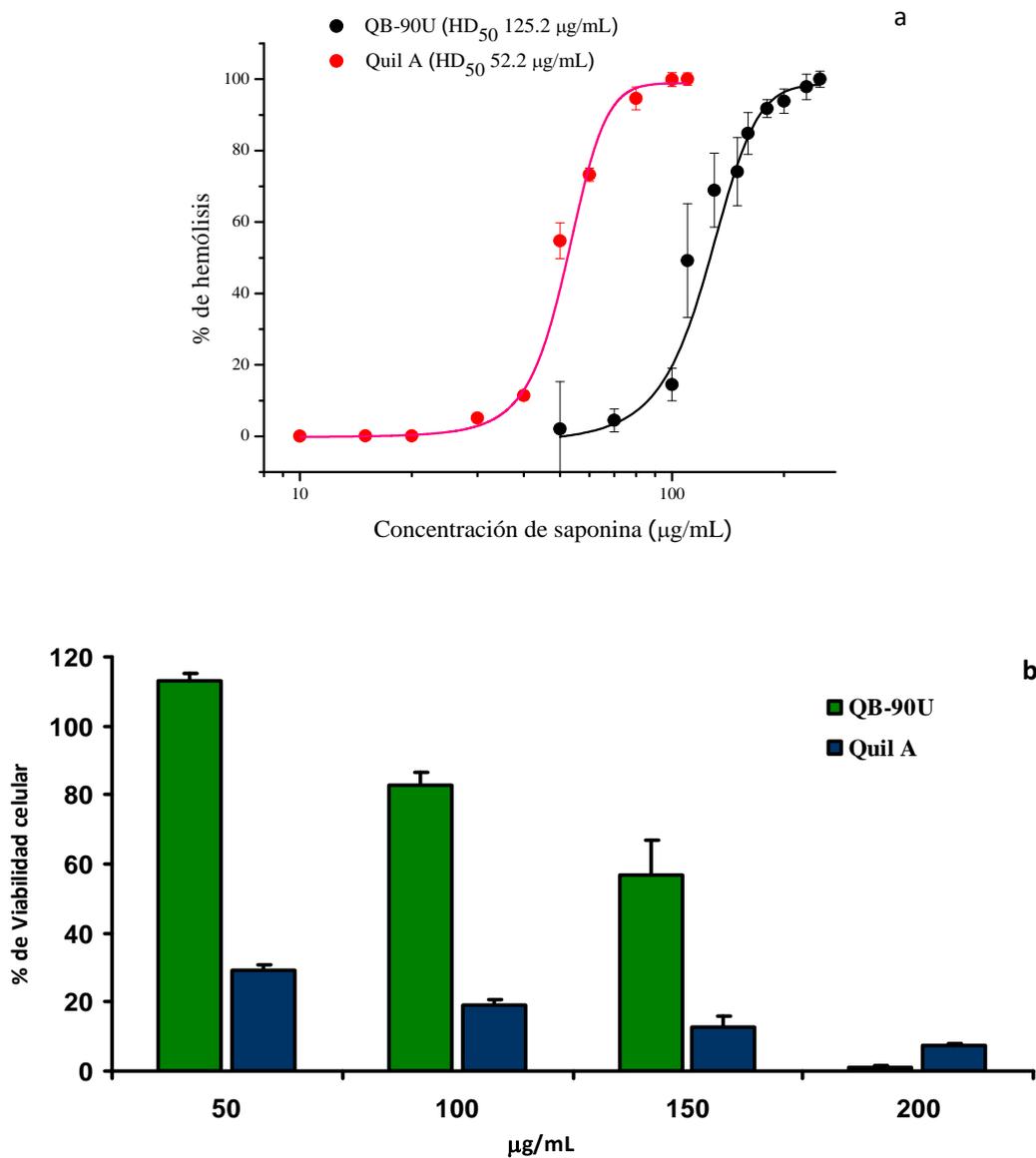


Figura 14. Toxicidad *in vitro* de QB-90U y Quil A.

a) Actividad hemolítica expresada en porcentaje de hemólisis referida a solución salina y SQS (250 µg/mL) que mostraron 0% y 100% de hemólisis, respectivamente. b) Ensayo de citotoxicidad sobre células VERO, la viabilidad celular fue medida luego de 48 horas del tratamiento con las diferentes concentraciones de saponinas de QB-90U o Quil A. Los resultados en a y b corresponden a la media ± S.D. ($n = 3$).

Se observó un comportamiento similar en el ensayo de toxicidad sobre células VERO, cuyos resultados se muestran en la Figura 14b. Para ambas preparaciones, se observó un efecto dosis dependiente. A la concentración utilizada para inmunizar, 100 µg/mL

para QB-90U y 50 µg/mL para Quil A, se observaron porcentajes de viabilidad celular muy diferentes: mayor al 80%. y 29 %, respectivamente.

La actividad hemolítica y citotoxicidad se han relacionado con características estructurales de las saponinas. Entre los factores que se han asociado a estos fenómenos se encuentran el número de monosacáridos, la complejidad de las fracciones glicosídicas [155] y/o la presencia de residuos acilos [110], que actuarían por mecanismos distintos [111]. También se ha reportado que algunas saponinas triterpénicas con gran actividad hemolítica poseen baja citotoxicidad, mientras que otras tienen reducida o nula actividad hemolítica y sin embargo presentan actividad citotóxica [111, 115]. En definitiva, aún no están claras las relaciones entre la estructura y la toxicidad de las saponinas, y más aún, todavía no se ha elucidado si se encuentran subyacentes uno o más mecanismos diferentes [230-232].

Estos resultados de actividad hemolítica y citotoxicidad, junto con los resultados de toxicidad *in vivo* aportados por Fleck y colb. [139], para QB-90, la fracción análoga obtenida de una muestra vegetal colectada en Brasil, permiten afirmar que estas extraídas de *Quillaja brasiliensis* presentan menos efectos secundarios que las saponinas de *Quillaja saponaria* [116, 118] usadas tradicionalmente como adyuvantes de vacunación.

3.1.2.2. Las saponinas de QB-90U inducen altos niveles de IgG anti-BoHV-5 que contiene anticuerpos neutralizantes

Los niveles de IgG total e isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b) en el suero de ratones inmunizados con BoHV-5 utilizando QB-90U (100 µg), alúmina (200 µg) o Quil A (50 µg) como adyuvantes se muestran en la Figura 15a. En todos los casos, se observaron aumentos significativos respecto al grupo control ($P < 0.01$, $P < 0.001$ ó $P < 0.001$, respectivamente). También se observaron niveles significativamente superiores respecto al grupo control para las subclases IgG1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ ó $P < 0.001$), IgG2a ($P < 0.001$, $P < 0.01$ ó $P < 0.05$) e IgG2b ($P < 0.001$, $P < 0.01$ ó $P < 0.05$). En particular, QB-90U y Quil A promovieron títulos más altos de IgG2a, sin diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$); en tanto que se encontraron diferencias significativas en los niveles de esta subclase entre QB-90U y alúmina ($P < 0.05$)

Los títulos de IgG3 fueron inferiores a los de las otras subclases y se representan por separado en la Figura 15b, por mayor claridad. Para esta subclase, los grupos QB-90U y Quil A mostraron niveles significativamente más elevados que el grupo control ($P < 0.01$ y $P < 0.05$, respectivamente).

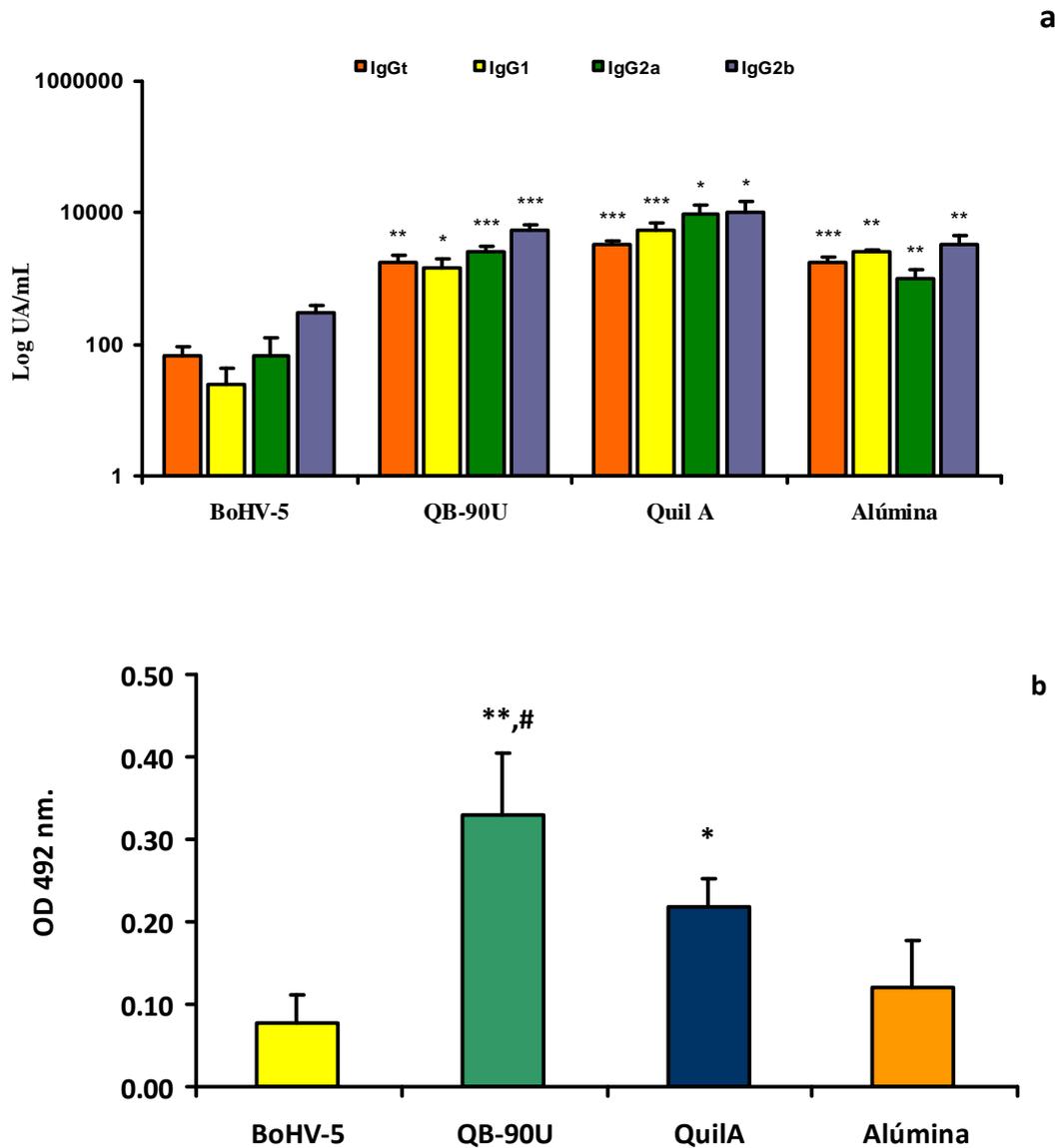


Figura 15. Respuesta de títulos de anticuerpos de ratones inmunizados con BoHV-5. a) Títulos de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b. b) Título de IgG3. Los ratones fueron inmunizados utilizando solamente BoHV-5 (sin adyuvante) o formulado con QB-90U, alúmina, o Quil A en los días 0 y 14. Los títulos de anticuerpos se cuantificaron en los sueros extraídos el día 28. Los valores están expresados en unidades arbitrarias (a) o densidad óptica (b) en base a la media \pm S.E. (n=6). Las diferencias significativas entre los grupos inmunizados con adyuvante y el control están indicadas como * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$). #: indica que se observó una diferencia significativa con el grupo inmunizado con alúmina ($P < 0.05$).

Es decir que las saponinas de QB-90U indujeron un aumento de los títulos de las IgG y estimularon significativamente la producción de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-BoHV-5. Los títulos de IgG total y subclases no presentaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados con QB-90U y Quil A. En lo relativo a la producción de IgG total, IgG1 e IgG2a, estos resultados son consistentes con los que obtuvieron Fleck y colb. Inmunizando ratones con BoHV-1 y QB-90 como adyuvante [139]. Además, revelan diferencias en el perfil de isotipos entre los animales inmunizados con alúmina y con las preparaciones de saponinas (QB-90U y Quil A). En efecto: por un lado, la producción de IgG2a fue significativamente mayor en los grupos QB-90U y Quil A, además, sólo las preparaciones de saponinas indujeron un aumento significativo de los niveles de IgG3.

Los resultados obtenidos con Quil A son concordantes con los de estudios previos que han establecido que las saponinas de Quil A y QS-21 inducen altos títulos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 [19, 50, 115, 120, 121], como producto de la participación tanto de células Th1 (que, en ratón, favorecen la producción de IgG2a e IgG3) como Th2 (que promueven el cambio de clase a IgG1). Considerados globalmente, los resultados indican que las saponinas de *Quillaja saponaria* y *brasiliensis* poseen un efecto adyuvante similar, diferente del de la alúmina, y que inducirían respuestas mixtas, con la participación de células Th1 y Th2 (Th1/Th2).

En la Figura 16, se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes en los distintos grupos. En los animales inmunizados con QB-90U y Quil A como adyuvantes se observó un marcado incremento con respecto a los inmunizados sin adyuvante o con alúmina

(estos últimos no mostraron diferencia entre sí). Estos resultados indican que la inmunización con el antígeno viral formulado con QB-90U o Quil A induce altos títulos de anticuerpos neutralizantes y en consecuencia, que generaría inmunoprotección.

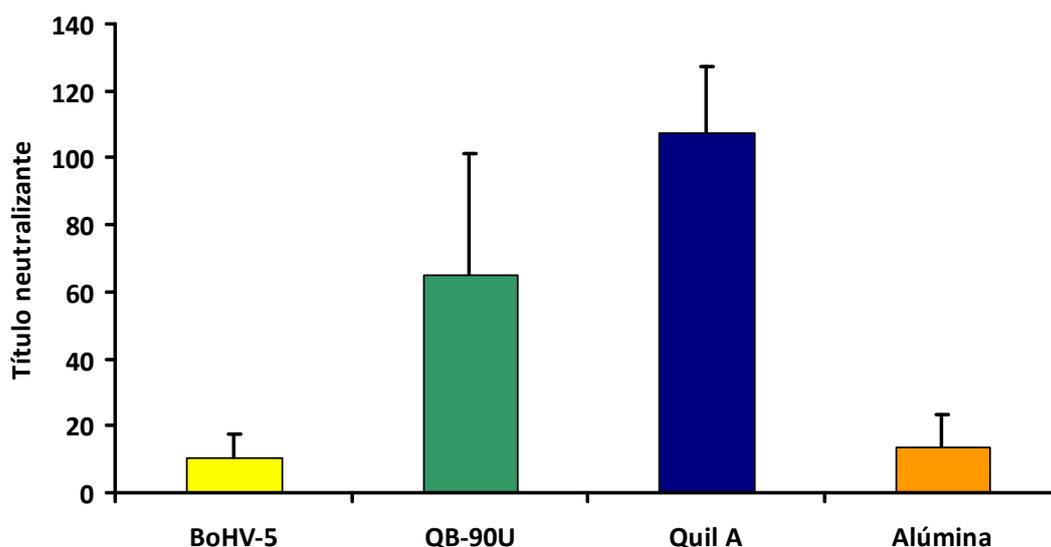


Figura 16. Títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de ratones inmunizados con BoHV-5 sin adyuvante o formulado con QB-90U, alúmina o Quil A. Los anticuerpos neutralizantes fueron determinados en sueros obtenidos el día 28.

3.1.2.3. Al igual que las de Quil A, las saponinas de QB-90U inducen la generación de células T CD4⁺ con fenotipo Th1

La Figura 17 muestra los resultados del ensayo de DTH en los diferentes grupos. Se observó una respuesta significativa en los grupos inmunizados con BoHV-5 formulado con QB-90U, alúmina y Quil A con respecto al grupo control ($P < 0.0001$, $P < 0.01$, y $P < 0.001$, respectivamente), aunque la respuesta fue algo mejor en el caso de la alúmina. La respuesta del grupo QB-90U fue significativamente superior a la del grupo alúmina ($P < 0.004$) y no mostró diferencias significativas con la del grupo Quil A. Considerando que una respuesta positiva a la prueba de DTH está gobernada por la presencia de

células T de memoria CD4⁺ y/o CD8⁺ (dependiendo del antígeno) [212, 233] el resultado indica que las saponinas de QB-90U inducirían una respuesta celular contra el antígeno similar a la desencadenada por las de Quil A.

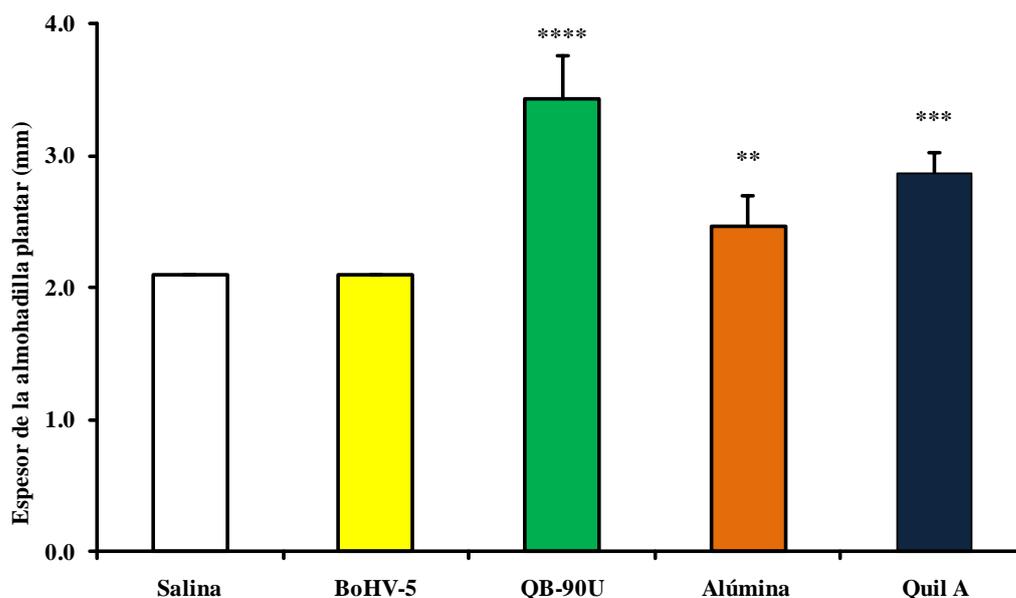


Figura 17. Reacción de DTH en ratones inmunizados con BoHV-5.

El ensayo se llevó a cabo dos semanas luego de la segunda inmunización con BoHV-5 sin adyuvante o formulado con QB-90U, alúmina o Quil A. Un grupo de animales fue inoculado con solución salina (sin antígeno) como control. Los valores corresponden a la media \pm S.D. (n=3). Las diferencias significativas con el grupo control están indicadas con: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) y **** ($P < 0.0001$); y entre el grupo QB-90U y el grupo alúmina con # ($P < 0.001$).

La Figura 18 muestra el resultado de los ensayos de proliferación de esplenocitos de los ratones inmunizados. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, si bien los animales inoculados con BoHV-5 presentaron mayores niveles de proliferación en respuesta al antígeno.

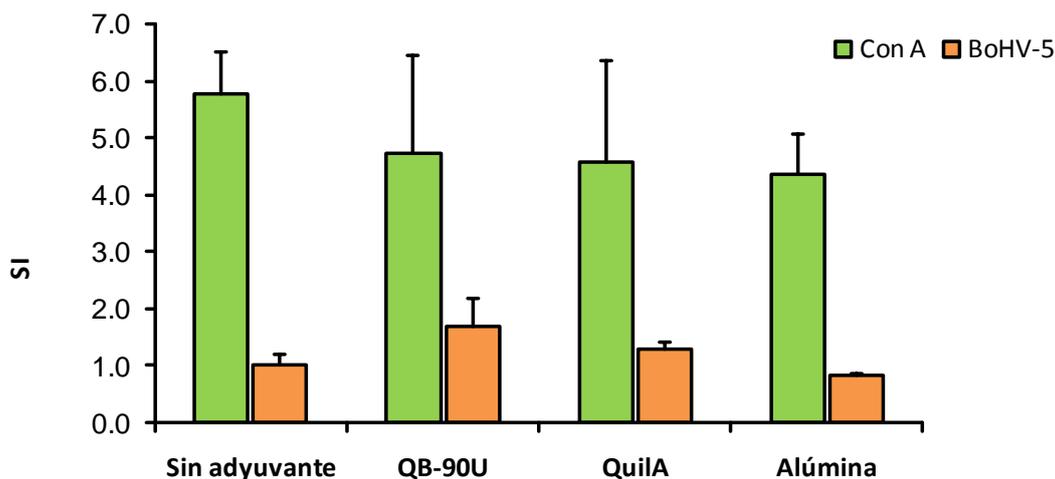


Figura 18. Ensayos de proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados. El ensayo se llevó a cabo dos semanas luego de la segunda inmunización con BoHV-5 sin adyuvante o formulado con QB-90U, alúmina o Quil A. Se muestra el índice de estimulación (SI) de los esplenocitos tratados con concavalina A (Con-A) o BoHV-5. Los valores corresponden a la media \pm S.D. (n=3).

Con la finalidad de conocer el tipo de células T CD4⁺ inducido por las saponinas de QB-90U, se analizó por PCR en tiempo real (RT-qPCR) la expresión de citoquinas que definen a las poblaciones Th1 y Th2 en esplenocitos de los ratones inmunizados. Para la población tipo 1, se analizó la expresión de IFN- γ e IL-2, y para la tipo 2, de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10.

La Figura 19 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las citoquinas tipo 1. En términos generales se observaron niveles más altos de ARNm de IFN- γ e IL-2 en los grupos inmunizados empleando QB-90U y Quil A como adyuvantes. En el caso del IFN- γ , las diferencias fueron estadísticamente significativas en esplenocitos no estimulados con el antígeno de los ratones del grupo QB-90U ($P < 0.05$) y en esplenocitos estimulados con el antígeno de los animales inmunizados con Quil A ($P < 0.05$) (Figura 19a). En el caso de la IL-2, se observaron diferencias significativas en todas las

muestras analizadas, esto es en esplenocitos estimulados y no estimulados con el antígeno de ratones inmunizados con QB-90U ($P < 0.01$ y $P < 0.05$, respectivamente) y Quil A ($P < 0.01$ y $P < 0.05$, respectivamente) (Figura 19b). No se observaron diferencias significativas en la expresión de IFN- γ ni de IL-2 en los ratones del grupo inmunizado con alúmina.

En el caso de las citoquinas tipo 2, el experimento no arrojó resultados, por lo que no se consideran en esta discusión. Este aspecto debería ser revisado porque, como hemos comentado, se sabe que la alúmina induce una respuesta tipo Th2 (ver1.7.1).

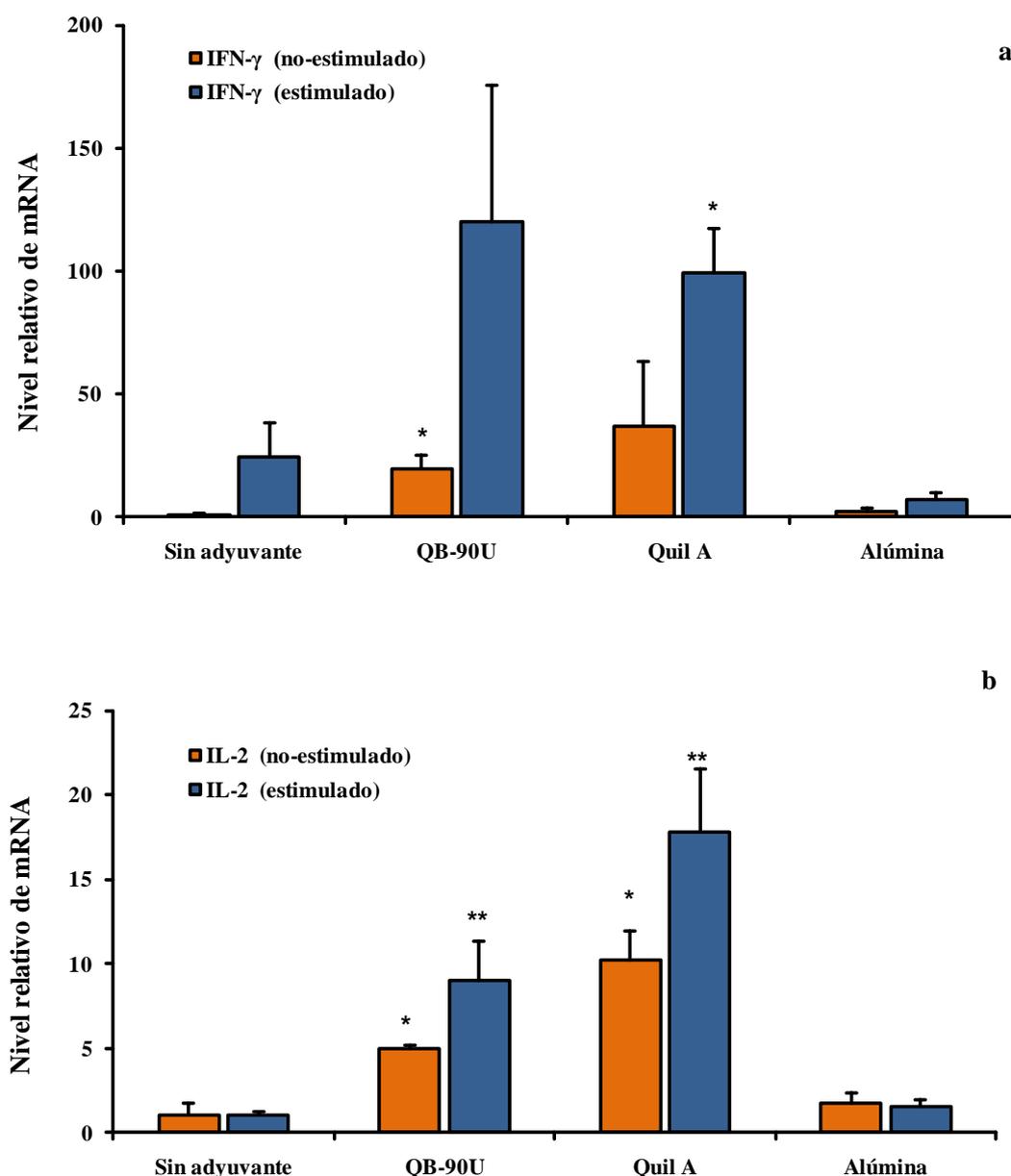


Figura 19. Expresión de citoquinas tipo Th1 (IFN- γ e IL-2). Niveles de mRNA de a) IFN- γ y b) IL-2, en esplenocitos de ratones inmunizados utilizando BoHV-5 solo (sin adyuvante) o formulado con QB-90U, alúmina, o Quil A, 120 días luego de la segunda dosis del antígeno. Los valores corresponden a la media \pm S.E (n = 3) de los niveles de ARNm relativos a los de los esplenocitos no estimulados del grupo control (sin adyuvante). Las diferencias significativas con respecto al grupo control se indican como * ($P < 0.05$) y ** ($P < 0.01$).

Los resultados de la expresión de INF- γ e IL-2 en los animales inmunizados empleando QB-90U y Quil A como adyuvantes son concordantes con reportes previos, en el sentido que las saponinas de *Quillaja* se caracterizan por estimular la secreción de

estas citoquinas, que definen a las células Th1 [50]. En efecto, se ha descrito en varios trabajos que las saponinas de *Quillaja*, co-administradas con un variado número de antígenos (o formuladas en ISCOMs), promueven la producción de INF- γ e IL-2 por las células T, un aumento en la secreción de anticuerpos IgG2a, IgG2b, IgG3 y una respuesta celular evidenciada por una reacción positiva a la DTH [42, 43, 50, 207, 208]. Nuestros resultados muestran que las saponinas QB-90U de *Quillaja brasiliensis* no solo poseen una capacidad de estimulación y modulación de la respuesta inmune contra un antígeno viral similar a las saponinas Quil A, sino que también presentan menores efectos secundarios que éstas. En términos generales, estos resultados sugieren por tanto que la inmunización con saponinas de *Quillaja* (QS-21) o ISCOMs genera una respuesta inmune potente que involucra la generación tanto de células T CD4⁺ tipo Th1 como tipo Th2 [50, 94].

3.1.2.4. Comentarios finales

Considerados globalmente, los resultados obtenidos en los ensayos de inmunización empleando la fracción QB-90U de saponinas de *Q. brasiliensis* muestran que son menos tóxicas que las saponinas de Quil A e igualmente efectivas como adyuvantes cuando son co-administradas con un antígeno viral. Tanto Quil A como QB-90U estimularon la producción de altos títulos de anticuerpos totales y neutralizantes así como una robusta respuesta DTH. Los perfiles de las subclases de IgG inducidos sugieren la activación de células T CD4⁺ del tipo Th2 (altos niveles de IgG1), así como Th1 (altos niveles de IgG2a e IgG3). La participación de esta última población celular (Th1) fue confirmada por el incremento en la expresión de mRNA de IL-2 e INF- γ en

esplenocitos procedentes de ratones inmunizados con estas saponinas. La baja toxicidad *in vitro* (nuestros resultados) e *in vivo* ([139]) de las saponinas de QB-90U, junto a su capacidad para promover fuertes respuestas humoral y celular al ser co-administradas con un antígeno viral, nos lleva a proponerlas como una interesante alternativa al adyuvante comercial Quil A.

3.2. Micelas mixtas de saponinas de *Q. saponaria* como adyuvantes de vacunación

En esta sección se discute la puesta a punto y evaluación como adyuvante de una formulación micelar binaria basada en saponinas (SQS) y esteroides (E). Se reporta el ajuste de la formulación en base a la reducción de la actividad hemolítica, y se presenta su evaluación como adyuvante en modelos murino y ovino empleando toxoide tetánico como antígeno.

3.2.1. La inclusión de saponinas de *Q. saponaria* en estructuras micelares mixtas reduce su actividad hemolítica

Actividad hemolítica de las saponinas de Q. saponaria

En la Figura 20 se muestran las curvas de hemólisis obtenidas para saponinas de *Q. saponaria* (SQS) y de *Gypsophila saponaria* (SG). SQS y SG presentan concentraciones hemolíticas 50% (CH50) de 3.0 y 48.1 µg/mL, respectivamente, lo que muestra la mayor actividad de la primera. La intensa actividad hemolítica de las saponinas de *Q. saponaria* se atribuye a su afinidad por el colesterol de las membranas biológicas, lo que lleva a su asociación, formación de poros y la subsecuente lisis celular [111, 145]. Esta capacidad lítica origina efectos locales en el sitio de inyección, lo que ha limitado su uso en medicina humana [116, 118]. Sin embargo, la interesante actividad adyuvante que presentan algunas saponinas, ha estimulado la búsqueda de nuevas saponinas con actividad adyuvante y menor actividad hemolítica, o como estrategia alternativa, el desarrollo de nuevas formulaciones que las contengan y que presenten menores efectos secundarios.

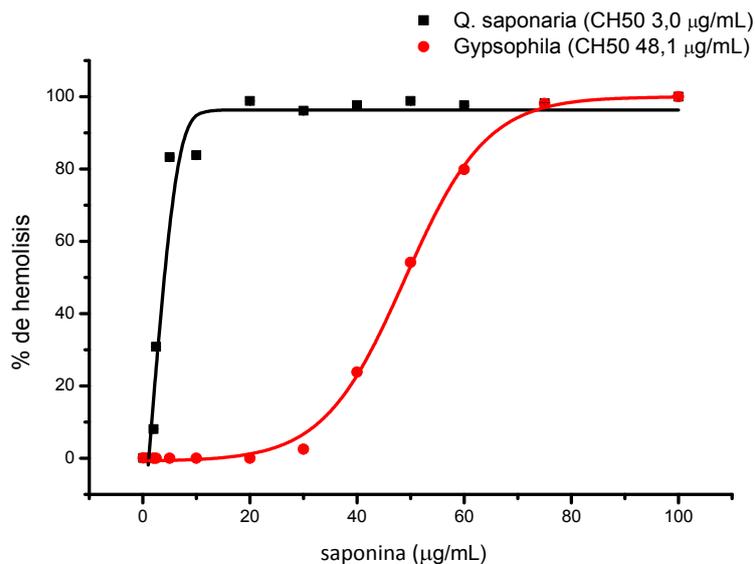


Figura 20. Actividad hemolítica de *Q. saponaria* (SQS) y *Gypsophila* sp. (SG).

Puesta a punto de la formulación en base a la disminución de la actividad hemolítica

En la Figura 21 se observa la actividad hemolítica de preparaciones de CSS variando la relación esterol/saponina (factor q), y evaluadas 7 días después de su formulación. Cada curva representa formulaciones en las cuales se mantiene constante la concentración de SQS (60, 120, 240 y 600 µg/mL) y se varia la relación q . Para cualquier formulación, un valor de $q = 0$ corresponde a una solución de SQS pura a la concentración correspondiente a cada curva. Para todas las curvas se observa un 100% de hemólisis para $q = 0$, aún para la concentración de saponinas más baja ensayada (60 µg/mL) (ver Figura 20 y 21).

En la Figura 21 se observa que la actividad hemolítica de las distintas formulaciones depende tanto de la concentración de SQS, así como de la relación q . En todas las curvas, excepto a la correspondiente a una concentración de SQS de 600 µg/mL, se observa una marcada disminución de la actividad hemolítica para ciertos rangos de

valores de q según la formulación específica que se trate. En particular, para las formulaciones conteniendo de 60 a 240 $\mu\text{g/mL}$ de SQS y para un valor de q en un rango aproximado de 3 a 5 se observó prácticamente ausencia de actividad hemolítica. Es de notar que la concentración de saponinas en todas estas formulaciones es más de 20 veces superiores a la CH50 de SQS (3.0 $\mu\text{g/mL}$, Figura 20).

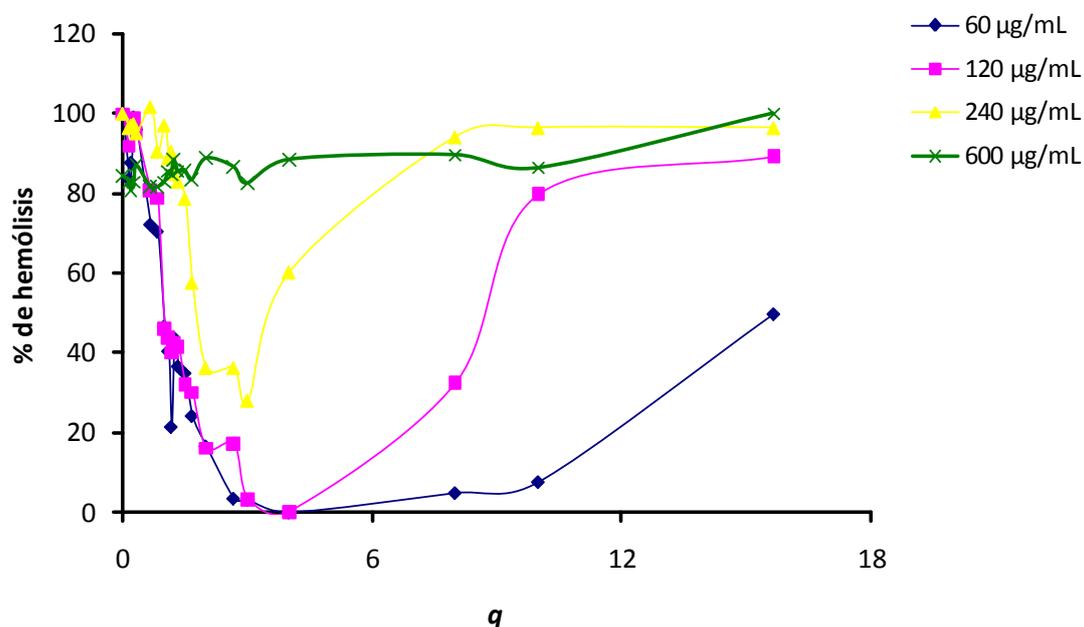


Figura 21. Actividad hemolítica de diferentes formulaciones CSS para distintas concentraciones de SQS y relaciones esterol/saponina (parámetro q)

De acuerdo a los resultados anteriores, las formulaciones micelares ensayadas en este trabajo, que denominamos CSS, fueron formuladas para una relación de composición $q=3$. Estas formulaciones, poseen una reducida actividad hemolítica en comparación con la que presentarían las saponinas de *Q. saponaria* a la misma concentración en la cual están incluídas en la formulación.

Se han reportado hallazgos similares de disminución de la actividad hemolítica en formulaciones preparadas en base a lípidos y saponinas derivadas de *Q. saponaria* denominadas por estos autores como Quil A y Quadri A [234]. La actividad de estas formulaciones depende de su composición específica, y del tipo de lípidos empleados, ya que a modo de ejemplo, en el trabajo mencionado se reporta que el nivel más bajo en la actividad hemolítica en sus formulaciones se presenta en una relación de lípido/saponina = 0.25, en tanto que en la formulación CSS, el mínimo de actividad hemolítica ocurre para una relación lípido/saponina (q) de 3 a 5 (ver Figura 21).

3.2.2. La formación de las micelas mixtas CSS es un proceso lento

En la Figura 22 se presenta la actividad hemolítica de preparaciones de CSS (conteniendo 120 y 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SQS) 24, 48 y 72 horas luego de su formulación. Como se observa en la figura, la actividad hemolítica es función de q y del tiempo de formulación (o maduración). Estos resultados indican que la cinética de formación de las micelas de CSS es lenta, ya que la disminución de la actividad hemolítica puede interpretarse como una consecuencia de la disminución de SQS libre a medida que ésta se asocia con esteroides para formar micelas mixtas. La caída en la actividad hemolítica observada es muy marcada, ya que en las mismas condiciones, una solución de SQS de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ producen un 100% de la hemólisis (ver Figura 20), mientras que en una solución coloidal de CSS conteniendo una concentración de SQS diez veces mayor (240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produce solo un 5% de hemólisis. Esta observación es similar a lo reportado para las formulaciones tipo ISCOMs e ISCOMATRIX, las cuales contienen Quil A [117, 165, 198, 235, 236].

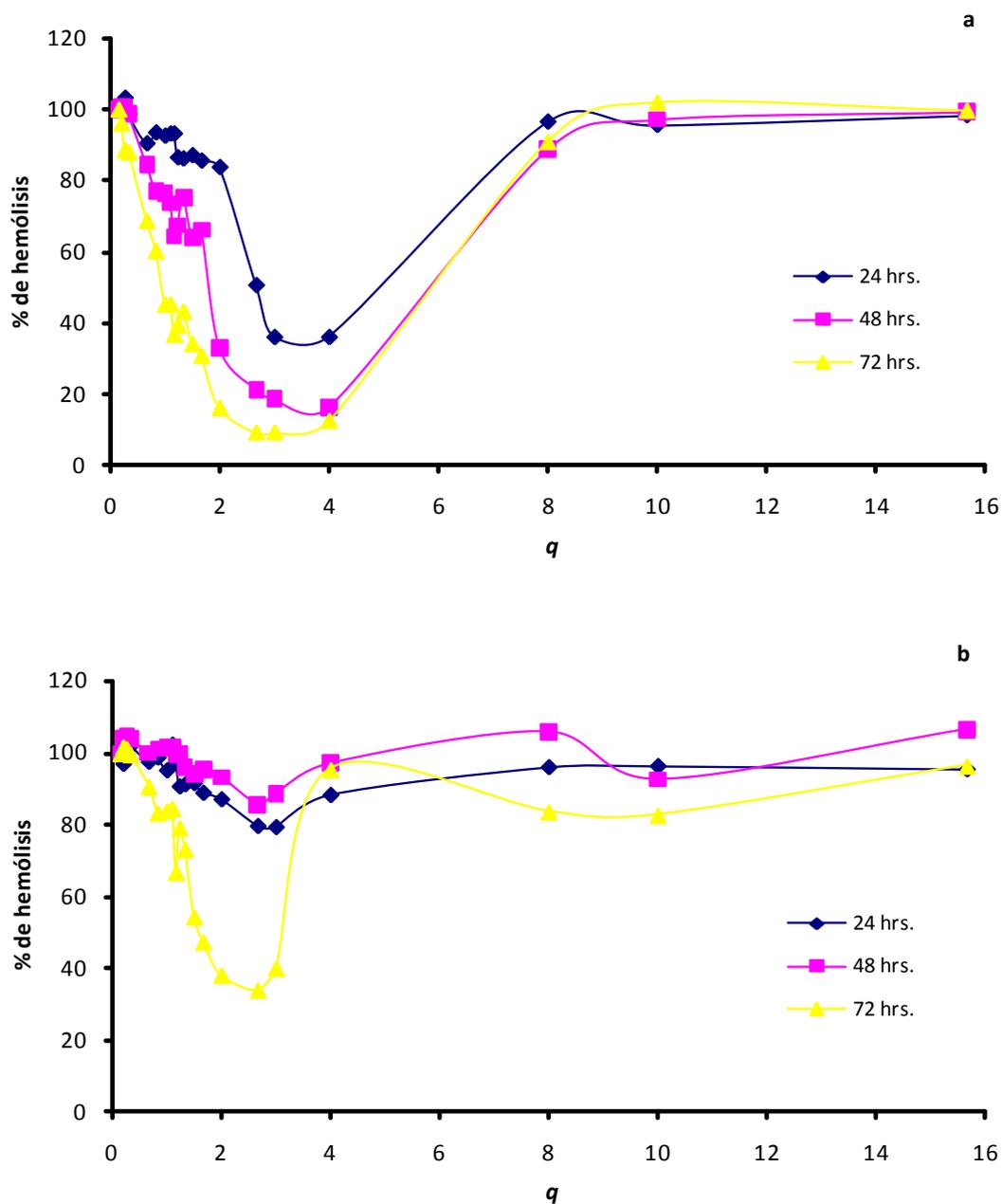


Figura 22. Actividad hemolítica de las formulaciones CSS en función del tiempo y de la composición (q). La actividad hemolítica fue evaluada a 24, 48 y 72 horas luego de la preparación de la formulación. Las concentraciones de SQS en las formulaciones son: (a) 120 µg/mL, y (b) 240 µg/mL

3.2.3. Las micelas mixtas CSS poseen estructuras filiformes

En la Figura 23 se muestran microfotografías electrónicas de preparados por tinción negativa de micelas de CSS a una concentración de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las micelas presentan una estructura filiforme de 100 a 500 nm de largo y de 10 a 15 nm de ancho. Estructuras micelares filiformes similares han sido reportadas en la bibliografía en preparados en base a Quil A, fosfolípidos y colesterol en diferentes proporciones [158, 236, 237] y recientemente se han reportado estructuras micelares filiformes en soluciones de saponinas de *Ilex paraguariensis* [162].

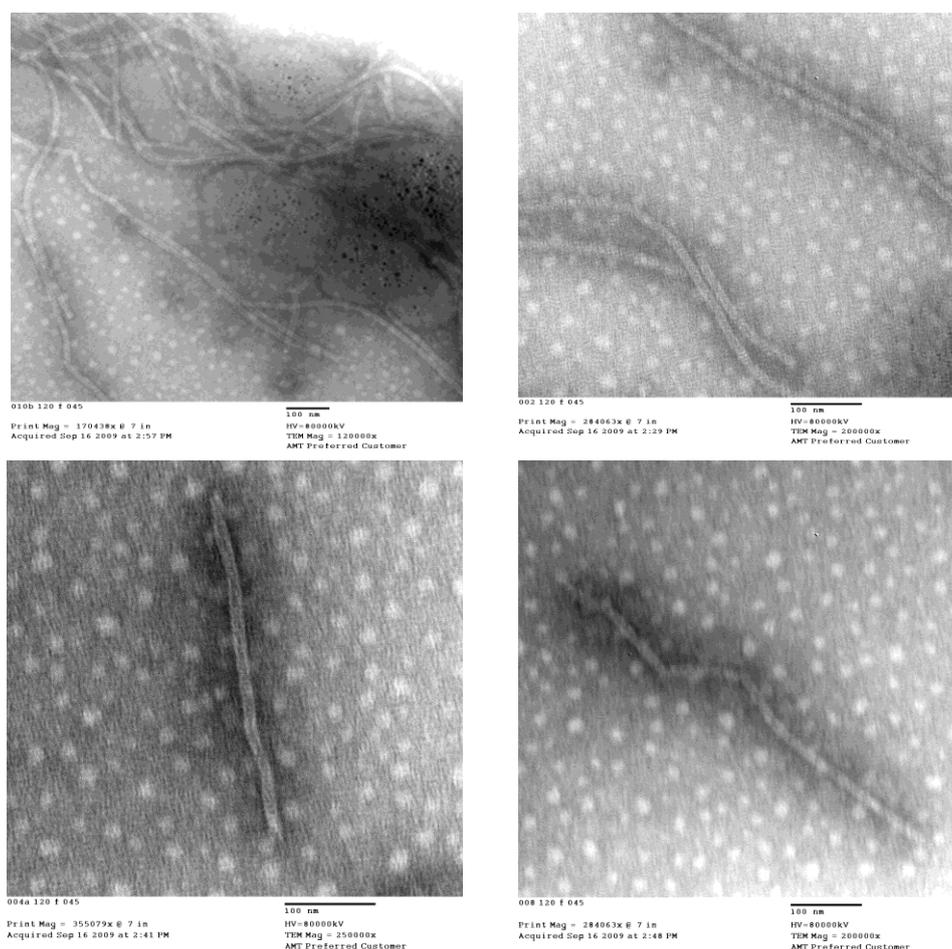


Figura 23. Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de micelas de CSS con tinción negativa.

Considerando nuestros hallazgos, en conjunto con las referencias bibliográficas se puede concluir que el tipo de micelas formadas depende tanto de la estructura de las saponinas empleadas como de la composición específica de la formulación.

3.2.4. La formulación CSS induce una fuerte respuesta humoral

Inmunización de ratones

Los títulos de IgG total contra TT empleando CSS o ADYUVAC50 como adyuvante en un modelo murino se muestran en la Figura 24. Los títulos de IgG total de los grupos CSS50 (50 µg/dosis de SQS) y CSS25 (25 µg/dosis de SQS) mostraron un aumento significativo ($P < 0.05$) en relación al grupo control (sólo TT) a partir del día 45 y a lo largo de todo el ensayo. Sin embargo, los títulos de IgG total del grupo ADYUVAC50 sólo mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el grupo control al día 45.

Al considerar los títulos de IgG anti-TT de los grupos en los cuales se incluyó adyuvante se observó, que los grupos CSS50 y CSS25 presentaron valores significativamente mayores ($P < 0.05$) con los grupos con SQS y ADYUVAC50, excepto en un caso (CSS25 al día 45). Es de destacar que, el grupo SQS no mostró diferencias con el grupo control ($P > 0.05$).

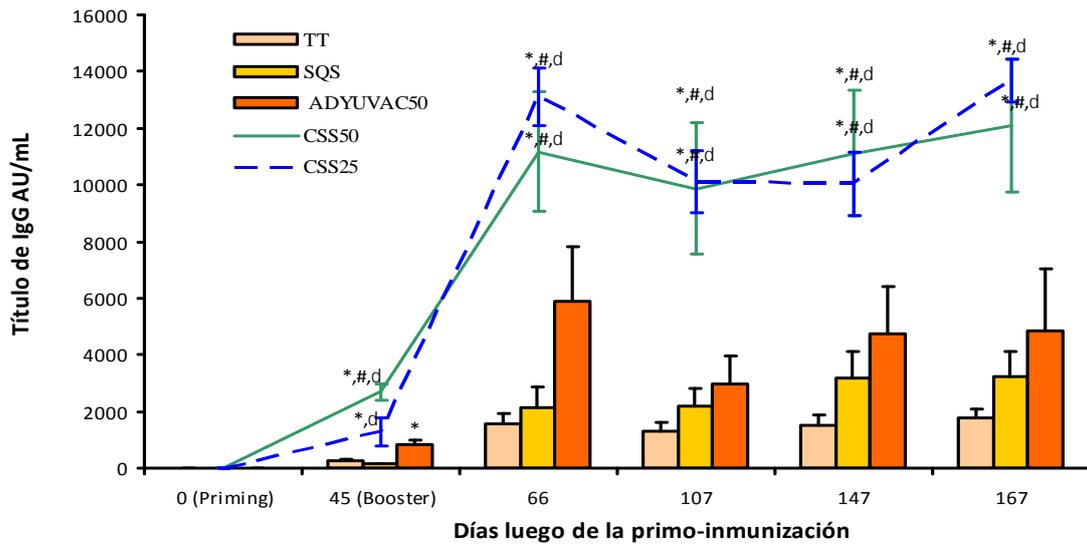


Figura 24. Evolución de los títulos de anticuerpos de IgG total contra TT en ratones. Los animales fueron inmunizados los días 0 (primo-inmunización) y 45 (refuerzo) con TT, sólo o adyuvantizado con SQS, ADYUVAC50, CSS50 o CSS25. Los datos son presentados como la media \pm SE (n=5). * Diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al grupo control (Sólo TT); # diferencias significativas con respecto al grupo ADYUVAC50; δ diferencias significativas con respecto al grupo SQS.

En la Figura 25 se muestran los títulos de las subclases de inmunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgG2b en suero de los distintos grupos de animales de experimentación inmunizados contra TT. Para la subclase IgG1 los grupos CSS50 y CSS25 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con los grupos control y SQS los días 107, 147 y 167. Al día 147 el grupo CSS25 también mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con el grupo ADYUVAC50. Los grupos ADYUVAC50 o SQS, mientras tanto, no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los títulos de éste isotipo con respecto al grupo control. Los grupos CSS50 y CSS25 mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los títulos de los isotipos IgG2a e IgG2b con los de los grupos control y SQS a los días 107, 147 y 167 del ensayo. Los títulos de los isotipos IgG2a e IgG2b del grupo CSS25 fueron significativamente diferentes de los del grupo ADYUVAC50 a los días 107, 147 y 167 del ensayo.

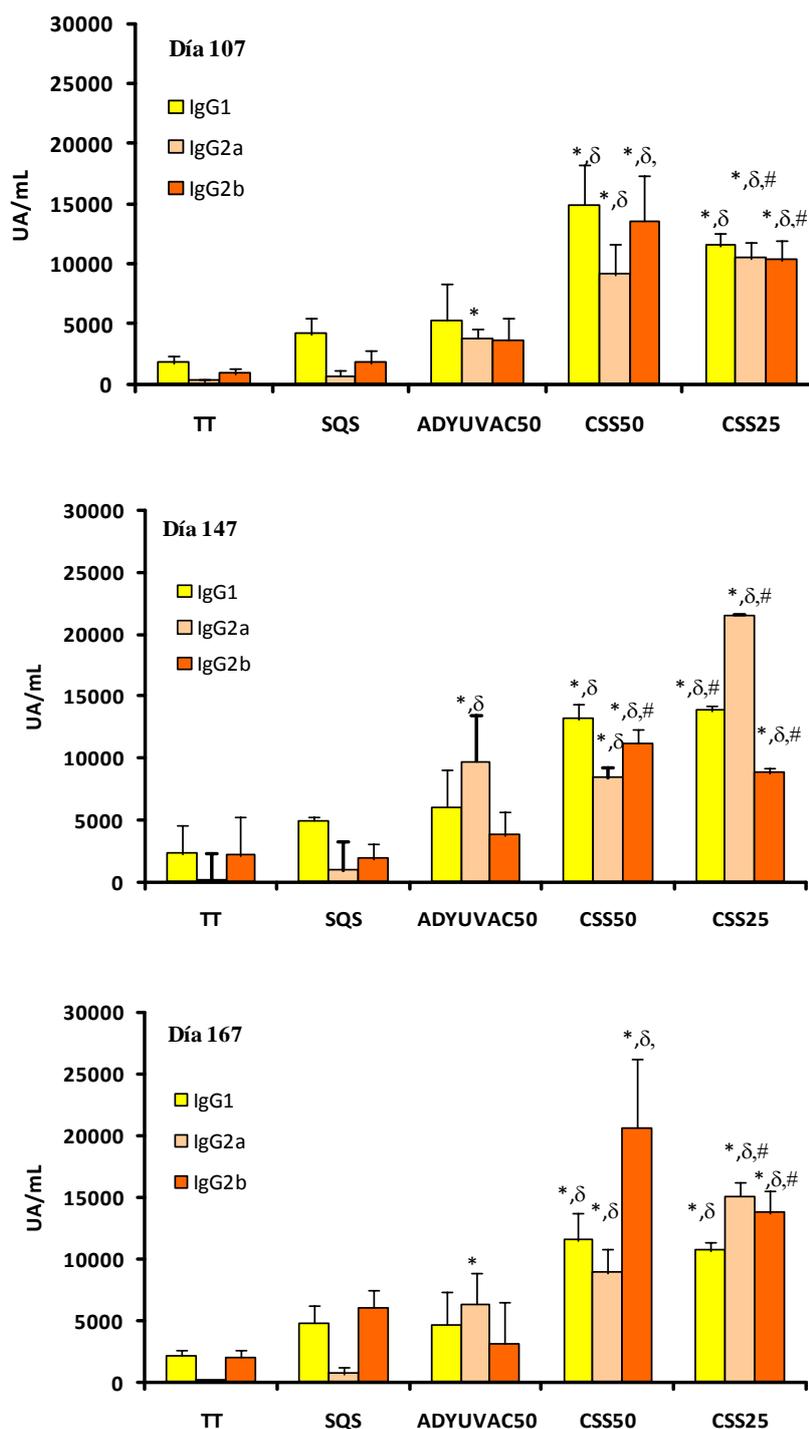


Figura 25. Títulos de anticuerpos de las subclase de IgG1, IgG2a and IgG2b contra TT en ratones.

Los títulos fueron evaluados los días 107, 147 y 167 luego de la primo-inmunización. Los ratones fueron inmunizados los días 0 (primo-inmunización) y 45 (refuerzo) con TT sólo o adyuvantizado con SQS, ADYUVAC50, CSS50 o CSS25. Los datos son presentados como la media \pm SE (n=5). * Diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al grupo control (Sólo TT); δ diferencias significativas con respecto al grupo SQS., # diferencias significativas con respecto al grupo ADYUVAC50.

Los títulos del isotipo IgG2a del grupo ADYUVAC50 mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con el grupos control a los días 107, 147 y 167, pero solo mostrò diferencias significativas con el grupo SQS al día 147 del ensayo. Para el isotipo IgG2b no se observaron diferencias significativas entre los grupos SQS o ADYUVAC50 con el grupo control.

Como ya se ha reportado en la bibliografía el TT es por sí mismo un buen inmunógeno [229, 238]. En base a ello en el esquema de inmunización se emplearon dosis de antígeno bajas, a fin de evitar la saturación de la respuesta humoral por administración de dosis excesivas de antígeno que dificultaran la expresión del posible efecto adyuvante de los productos ensayados. Por esta razón, y en base experimentos previos realizados por integrantes del grupo, se empleó en los ensayos de inmunización una dosis de TT equivalentes a 0.25 Lf, equivalente a 1/40 ava parte de la dosis empleada en humanos.

El incremento inducido en la repuesta humoral por el adyuvante CSS fue significativamente superior al generado por los adyuvantes SQS y oleoso (ADYUVAC50) utilizados como controles positivos en este modelo murino. A nivel general, podemos observar que la producción de IgG total y de los isotipos analizados (IgG1, IgG2a e IgG2b) contra TT al emplear las formulaciones CSS50 y CSS25 tuvieron comportamientos similares. Los títulos de IgG total en el grupo CSS25 fueron aún superiores a los que presentaron el grupo CSS50 a pesar que no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($P > 0.05$). El adyuvante CSS estimuló la producción de títulos más elevados de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Este perfil de

estimulación de la secreción de estos tres isotipos de inmunoglobulinas ha sido descrito para las formulaciones tipo ISCOMs en modelo murino [50].

La formulación CSS también incremento la duración de la respuesta humoral ya que los títulos de IgG total e isotipos se mantuvieron elevados aún casi 6 meses después de la primo-inmunización.

En resumen, la formulación CSS basadas en las saponinas SQS demostró ser *menos hemolítica y más efectiva* en la estimulación de la respuesta humoral anti-TT que SQS o el adyuvante oleoso comercial ADYUVAC50. Los resultados obtenidos para estas formulaciones son similares a los descritos para otras formulaciones micelares de saponinas, como las denominadas ISCOMs, ISCOMATRIXTM, RAM y “Worm-like”, las cuáles también han resultado ser menos tóxicas y más efectivas para la promoción de una respuesta inmune humoral que las saponinas que las constituyen [143, 159, 160, 165, 198, 239].

Inmunización en ovejas

En la Figura 26 se muestran los títulos de IgG totales anti-TT en ovejas inmunizadas con TT solo, o con el agregado del adyuvante oleoso ADYUVAC50, o de la formulación CSS a diferentes concentraciones (600, 1200 y 2400 µg/mL). Todos los animales fueron inmunizados con 1 Lf de TT en un volumen total de 1 mL.

Todos los grupos inmunizados con formulación que incluían algún tipo de adyuvante mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el grupo control a lo largo de todo el experimento, excepto para el grupo ADYUVAC50 y CSS1200 al día 194. Con la primo-inmunización se observaron títulos más elevados de anticuerpos en el grupo

ADYUVAC50 que en los grupos CSS, pero sin embargo estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos con ADYUVAC50 y CSS1200.

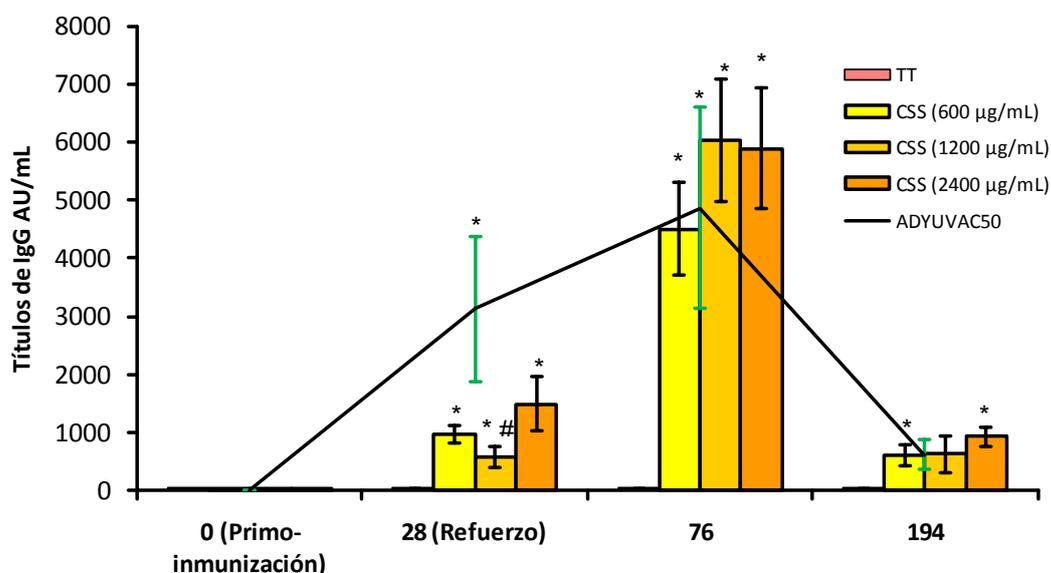


Figura 26. Evolución de los títulos de IgG total contra TT en ovejas. Las ovejas fueron inmunizadas los días 0 (primo-inmunización) y 28 (refuerzo) con TT solo o adyuvantizado con ADYUVAC50 o CSS a distintas concentraciones. Los animales fueron sangrados los días 0, 28, 76 y 194. Los datos son presentados como la media \pm SE. * diferencias significativas con respecto al grupo control (sólo TT); # diferencias significativas entre el grupo inmunizado con ADYUVAC50 y CSS1200.

Los títulos de IgG luego de la segunda inmunización en todos los grupos que recibieron adyuvante aumentaron de manera marcada y estadísticamente diferentes del grupo control, no presentando diferencias estadísticas entre sí. Al día 194 sólo las formulaciones CSS600 y CSS2400 presentaron diferencias significativas con el grupo control ($P < 0.05$).

Si bien el grupo de ADYUVAC50 presentó los títulos de IgG totales más altos luego de la primo-inmunización, los adyuvantes oleosos en general presentan la desventaja de

producir efectos secundarios importantes (granuloma, eritema, absceso e inflamación) en el sitio de inoculación [240-243]. En contraste, los adyuvantes micelares desarrollados en el presente trabajo a la vez que promovieron una intensa respuesta humoral, no presentaron ningún efecto secundario apreciable. Este aspecto es de gran importancia económica, ya que los efectos secundarios locales asociados al proceso de inmunización no solo producen dolor y molestias al animal, sino que también afectan negativamente la calidad de la carne y las pieles [240].

Los títulos de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 se muestran en la Figura 27. Todos los grupos inmunizados con TT y que incluían adyuvantes en la formulación dieron títulos cuantificables para ambas subclases de inmunoglobulinas. Sin embargo, sólo las formulaciones con CSS mostraron diferencias significativas con el grupo control ($P < 0.05$), dando los títulos más elevados de IgG1 e IgG2 al día 76 los cuales disminuyeron al día 194, pero siempre manteniendo diferencias significativas con el grupo control para ambas subclases ($P < 0.05$ ó $P < 0.01$).

A los días 28, 76 y 194 del ensayo de inmunización, ADYUVAC50 presentó niveles más altos de anticuerpos para ambas subclases que los demás grupos, pero estas diferencias no fueron significativas con respecto al grupo control (sin adyuvante), lo que seguramente está relacionado con la elevada dispersión en los valores de los títulos dentro de éste grupo.

Existen pocas referencias de trabajos previos sobre el efecto adyuvante de formulaciones micelares de saponinas en ovinos. Son de particular interés ensayos

donde este tipo de adyuvantes co-administrados con antígenos proteicos o proteínas recombinantes [244, 245] generaron títulos de anticuerpos más elevados contra el antígeno que en grupos inmunizados empleando adyuvante oleoso o saponinas. En estos estudios [245] se utilizaron saponinas como adyuvantes para inmunizar ovinos contra una proteína recombinante de *Taenia ovis*, logrando una excelente protección que se evidenció por una reducción del 99% en el grado de infectación en un ensayo de desafío realizado un mes después de la inmunización. Es de resaltar que las dosis de saponinas utilizadas por animal en este estudio fueron de 5 a 50 mg/dosis, mientras que las formulaciones CSS empleadas en nuestro estudio contienen 0.6, 1.2 y 2.4 mg/dosis, es decir cantidades de saponinas un orden de magnitud inferior. Sin perjuicio de ello, se logró la generación de una intensa respuesta inmune humoral, con títulos de anticuerpos similares a los obtenidos con el adyuvante oleoso (ADYUVAC50).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Harrison *et al.* [245] en el sentido que tanto los adyuvantes oleosos como los basados en saponinas estimularon la producción de ambas subclases de inmunoglobulinas.

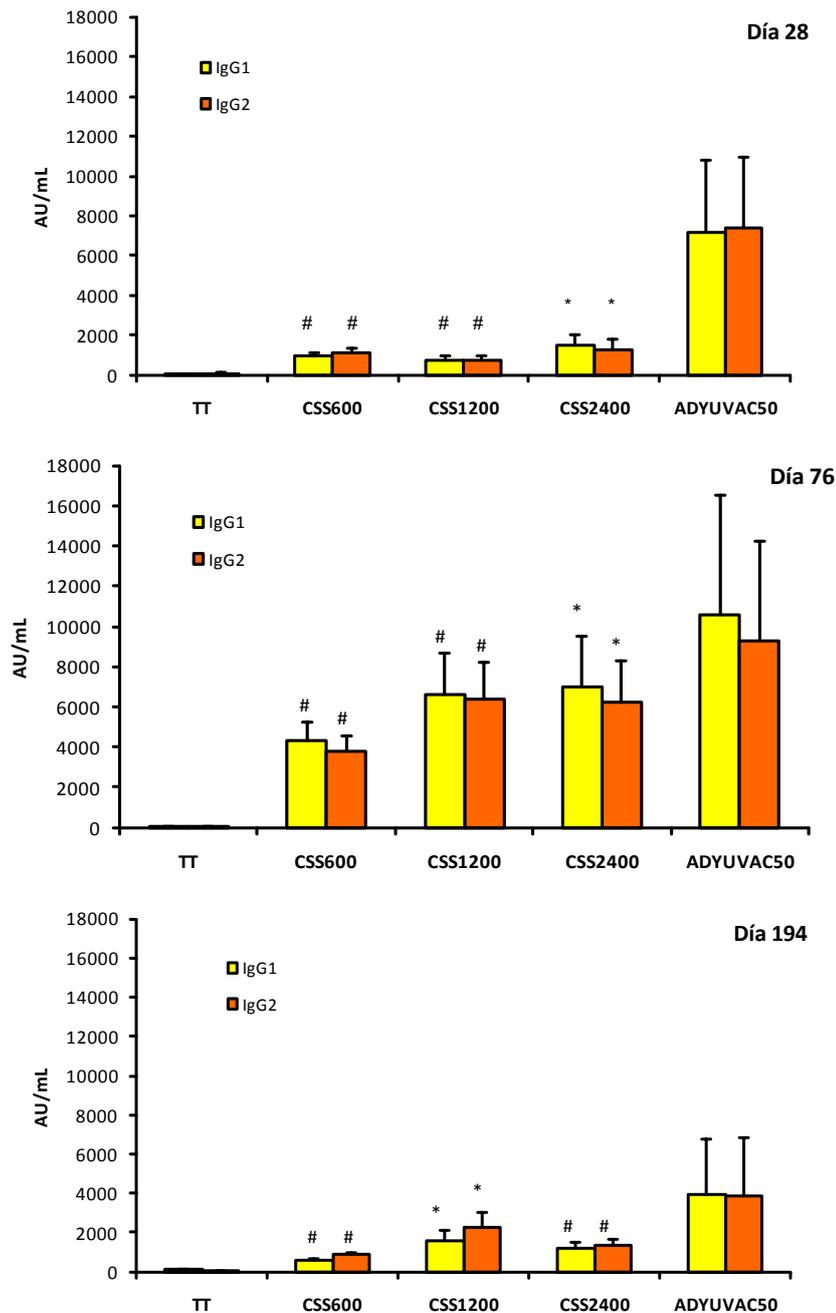


Figura 27. Títulos de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2 contra TT en ovejas. para los días 28, 76 y 194 del ensayo. Las ovejas fueron inmunizadas los días 0 (primo-inmunización) y 45 (refuerzo) con TT solo o incorporando los adyuvantes ADYUVAC50 o CSS (600, 1200 o 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos son presentados como la media \pm SE (n=5). * y # representan diferencias significativas con respecto al grupo control ($P < 0.05$ o $P < 0.01$, respectivamente).

3.2.5. Comentarios finales

Las micelas mixtas de esteroides y saponinas, y que hemos denominado CSS, han mostrado ser menos tóxicas y más efectivas en la inducción de una intensa respuesta humoral que las saponinas que las componen, tanto en animales de laboratorio como de producción. Estas micelas filiformes, de lenta formación en la solución coloidal, resultaron tanto o más efectivas que un adyuvante oleoso comercial, a la vez que resultaron menos tóxicas, no detectándose ningún efecto secundario. Los perfiles de isotipos generados en ambos modelos animales mostraron la inducción balanceada de los distintos isotipos, sugiriendo, en principio, la estimulación tanto de una respuesta tipo Th1 (altos niveles de IgG2) como tipo Th2 (altos niveles de IgG1).

4. DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se analizaron la toxicidad y la actividad adyuvante de diferentes saponinas triterpénicas de origen natural pertenecientes a la flora sudamericana. Se estudiaron saponinas puras de *Ilex* spp. y *Passiflora alata*, mezcla de saponinas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90U) y formulaciones micelares mixtas (CSS) obtenidas a partir de saponinas de *Quillaja saponaria* (SQS).

Las saponinas ensayadas (puras, mezclas y formulaciones) demostraron ser menos tóxicas que las saponinas de *Quillaja saponaria* (SQS o Quil A) las cuales fueron utilizadas como control. En particular, la actividad hemolítica de QB-90U como su actividad citotóxica sobre células VERO demostró ser menor que la de las saponinas de Quil A, lo cual podría sugerir menores efectos secundarios al ser co-administradas junto al antígeno en el proceso de inmunización. Si bien no está claro cuáles son las características que confieren mayor o menor toxicidad a las saponinas, el mecanismo propuesto para las de *Q. saponaria* (las más estudiadas) está relacionado con las interacciones que estas moléculas forman con el colesterol de las membranas celulares. En este sentido, tanto el tipo de aglicona como las cadenas lipofílicas laterales presentes en las saponinas formarían interacciones estables con el colesterol de las membranas provocando la lisis de la célula. Sin embargo aun no está claro la relación entre estructura y actividad que presentan las saponinas con las células.

Las saponinas de *Ilex* spp. y *Passiflora alata* demostraron ser muy poco hemolíticas y en lo que se refiere al título de anticuerpos y DTH promovieron en algunos casos una respuesta inmune similar a la que produjo la alúmina. Es de resaltar que el nivel de los títulos de anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados con estas saponinas, no se diferenciaron significativamente de los títulos del grupo control (solo TT). Sin

embargo, la respuesta celular (medida por DTH) promovida por las saponinas ensayadas mostró ser más potente que la inducida por el grupo control. El uso de TT como antígeno pudo enmascarar el efecto adyuvante que estas saponinas podrían haber promovido. En este caso, la utilización de un antígeno menos inmunogénico como por ejemplo OVA podría haber sido recomendable.

Por otro lado, las saponinas de QB-90U mostraron una actividad adyuvante similar a la que presentaron las saponinas de Quil A siendo estos resultados concordantes con reportes previos sobre la actividad adyuvante de saponinas de *Q. brasiliensis* (QB-90). Las saponinas de QB-90U promovieron elevados títulos de IgG los cuales contenían también, anticuerpos neutralizantes. Así mismo estimularon significativamente la producción de isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-BoHV-5 e indujeron una robusta DTH con la proliferación de células TCD4⁺ con perfil Th1 evidenciado por la producción de INF- γ e IL-2. Las saponinas de QB-90U a la vez que mostraron ser muy efectivas en la inducción de la respuesta inmune humoral y celular contra el antígeno viral se caracterizaron también por ser menos tóxicas tanto en modelo *in vivo* como *in vitro* por lo cual podrían ser utilizadas como alternativa a las saponinas de Quil A. Los resultados reportados en esta tesis sobre anticuerpos neutralizantes contra BoHV-5, junto a una respuesta positiva a la DTH así como también la determinación de citoquinas relacionadas con un perfil Th1 aportan nuevos datos sobre el potencial que las saponinas de QB-90U promueven en el contexto de la inmunización en animales de experimentación cuando son co-administradas con un antígeno viral.

Finalmente, se desarrollaron micelas mixtas en base a esteroides y SQS que denominamos CSS. Los CSS se caracterizaron por tener una cinética lenta de

formación, con estructuras filiformes de tamaño variable. Estas nuevas formulaciones al igual que otras ya descritas en la literatura (ISCOMs) demostraron ser menos tóxicas que las saponinas que las constituyen. Se postula que las saponinas formarían asociaciones estables con los esteroides evitando su interacción con el colesterol de las membranas y de esta forma evitar la lisis celular. Los CSS promovieron mayores títulos de anticuerpos (IgG total e isotipos) en relación a los controles utilizados (adyuvante oleoso y solo SQS) en los modelos murino como ovino. Estas nuevas formulaciones micelares evidenciaron tanto por su simple diseño, su bajo costo, así como también por la gran actividad inmuno-estimulante que promueven, que podrían ser utilizadas como un adyuvante alternativo en animales de producción.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Leroux-Roels, G., *Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response*. *Vaccine*, 2010. **28 Suppl 3**: p. C25-36.
2. Leclerc, C., *New approaches in vaccine development*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2003. **26**(5-6): p. 329-41.
3. Lima, K.M., et al., *Vaccine adjuvant: it makes the difference*. *Vaccine*, 2004. **22**(19): p. 2374-9.
4. Reed, S.G., et al., *New horizons in adjuvants for vaccine development*. *Trends Immunol*, 2008.
5. 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*, 2011. **29**(48): p. 9057-63.
6. Maggioli, G., et al., *A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from Fasciola hepatica induces a protective response in rabbits*. *Exp Parasitol*.
7. O'Hagan, D.T. and E. De Gregorio, *The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'*. *Drug Discov Today*, 2009. **14**(11-12): p. 541-51.
8. Ramon, G., *Sur la toxine et sur l'anatoxine diphteriques*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924. **38**: p. 1-10.
9. Franco, D., M. Giraldo, and P. Patiño, *Franco, D.; Giraldo M. & . 2004. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune*. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 2004. **17**(3): p. 280-289.
10. Harlow, E. and D. Lane, , in *Antibodies: A laboratory manual*, C.S.H. Laboratory, Editor. 1988: USA. p. 726 pp.
11. Kenney, R.T. and R. Edelman, *Survey of human-use adjuvants*. *Expert Rev Vaccines*, 2003. **2**(2): p. 167-88.
12. Coffman, R.L., A. Sher, and R.A. Seder, *Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work*. *Immunity*. **33**(4): p. 492-503.
13. Baldridge, J.R. and J.R. Ward, *Effective adjuvants for the induction of antigen-specific delayed-type hypersensitivity*. *Vaccine*, 1997. **15**(4): p. 395-401.
14. Castro-Diaz, N., et al., *Saponins from the Spanish saffron Crocus sativus are efficient adjuvants for protein-based vaccines*. *Vaccine*.
15. Mbow, M.L., et al., *New adjuvants for human vaccines*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(3): p. 411-6.
16. Mastelic, B., et al., *Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design*. *Biologicals*, 2010. **38**(5): p. 594-601.
17. Bendelac, A. and R. Medzhitov, *Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity*. *J Exp Med*, 2002. **195**(5): p. F19-23.
18. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
19. Guy, B., *The perfect mix: recent progress in adjuvant research*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(7): p. 505-17.
20. Petrovsky, N., *Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma*. *Expert Rev Vaccines*, 2008. **7**(1): p. 7-10.
21. Marciani, D.J., *Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity*. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(20): p. 934-43.
22. O'Hagan, D.T., M.L. MacKichan, and M. Singh, *Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases*. *Biomol Eng*, 2001. **18**(3): p. 69-85.
23. Singh, M. and D.T. O'Hagan, *Recent advances in veterinary vaccine adjuvants*. *Int J Parasitol*, 2003. **33**(5-6): p. 469-78.

24. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
25. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell. **140**(6): p. 805-20.
26. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
27. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
28. Ma, X., *TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning*. Microbes Infect, 2001. **3**(2): p. 121-9.
29. Parish, C., *Innate immune mechanisms: nonself recognition*. Encyclopedia of life sciences, 2001: p. 1-8.
30. Janeway, C., et al., *Immuno Biology, The immune system in health and disease*, ed. t.E.G. Science. 2005, New York & London. 823 pp.
31. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science. **327**(5963): p. 291-5.
32. Petrovsky, N. and J.C. Aguilar, *Vaccine adjuvants: current state and future trends*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 488-96.
33. O'Hagan, D.T., M. Singh, and J.B. Ulmer, *Microparticles for the delivery of DNA vaccines*. Immunol Rev, 2004. **199**: p. 191-200.
34. Brewer, J.M., *(How) do aluminium adjuvants work?* Immunol Lett, 2006. **102**(1): p. 10-5.
35. Schijns, V.E., *Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants*. Crit Rev Immunol, 2001. **21**(1-3): p. 75-85.
36. Schijns, V.E., *Antigen delivery systems and immunostimulation*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(3-4): p. 195-8.
37. Bousso, P., *T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 675-84.
38. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
39. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 337-48.
40. Nakayama, T. and M. Yamashita, *The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation*. Semin Immunol, 2010. **22**(5): p. 303-9.
41. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
42. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
43. Cher, D.J. and T.R. Mosmann, *Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3688-94.
44. Serre, K., et al., *IL-4 directs both CD4 and CD8 T cells to produce Th2 cytokines in vitro, but only CD4 T cells produce these cytokines in response to alum-precipitated protein in vivo*. Mol Immunol, 2010. **47**(10): p. 1914-22.
45. Punnonen, J., H. Yssel, and J.E. de Vries, *The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. 792-801.

46. Katayama, S. and Y. Mine, *Quillaja saponin can modulate ovalbumin-induced IgE allergic responses through regulation of Th1/Th2 balance in a murine model*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(9): p. 3271-6.
47. Brewer, J.M., et al., *Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6448-54.
48. Brewer, J.M. and J. Alexander, *Cytokines and the mechanisms of action of vaccine adjuvants*. Cytokines Cell Mol Ther, 1997. **3**(4): p. 233-46.
49. Grun, J.L. and P.H. Maurer, *Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses*. Cell Immunol, 1989. **121**(1): p. 134-45.
50. Sjolander, A., B. van't Land, and K. Lovgren Bengtsson, *Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses*. Cell Immunol, 1997. **177**(1): p. 69-76.
51. Zhao, Y., et al., *Th17 immunity in patients with allergic asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. **151**(4): p. 297-307.
52. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
53. Marciani, D.J., et al., *Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity*. Vaccine, 2000. **18**(27): p. 3141-51.
54. O'Brien, J., *11th Annual Conference on Vaccine Research*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(6): p. 721-3.
55. O'Hagan, D.T. and M. Singh, *Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems*. Expert Rev Vaccines, 2003. **2**(2): p. 269-83.
56. De Gregorio, E., U. D'Oro, and A. Wack, *Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(3): p. 339-45.
57. Cox, J.C. and A.R. Coulter, *Adjuvants--a classification and review of their modes of action*. Vaccine, 1997. **15**(3): p. 248-56.
58. Tritto, E., F. Mosca, and E. De Gregorio, *Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants*. Vaccine, 2009. **27**(25-26): p. 3331-4.
59. Allison, A.G. and G. Gregoriadis, *Liposomes as immunological adjuvants*. Nature, 1974. **252**(5480): p. 252.
60. Garcon, N., P. Chomez, and M. Van Mechelen, *GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 723-39.
61. Ellouz, F., et al., *Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **59**(4): p. 1317-25.
62. Woodhour, A.F., et al., *Hyperpotentiation by synthetic double-stranded RNA of antibody responses to influenza virus vaccine in adjuvant 65*. Proc Soc Exp Biol Med, 1969. **131**(3): p. 809-17.
63. Glenny, A.T., et al., *XXIII-the antigenic value of toxoid precipitated by alum*. J. Pathol. Bacteriol., 1926. **29**: p. 31-40.
64. Baylor, N.W., W. Egan, and P. Richman, *Aluminum salts in vaccines--US perspective*. Vaccine, 2002. **20 Suppl 3**: p. S18-23.
65. Exley, C., P. Siesjo, and H. Eriksson, *The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?* Trends Immunol, 2010. **31**(3): p. 103-9.

66. Aimanianda, V., et al., *Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(6): p. 287-95.
67. Petrilli, V., et al., *Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
68. Petrilli, V., et al., *The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 615-22.
69. Morefield, G.L., et al., *Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro*. Vaccine, 2005. **23**(13): p. 1588-95.
70. Walls, R.S., *Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms*. Proc Soc Exp Biol Med, 1977. **156**(3): p. 431-5.
71. Nagel, J.E., et al., *IgE synthesis in man. II. Comparison of tetanus and diphtheria IgE antibody in allergic and nonallergic children*. J Allergy Clin Immunol, 1979. **63**(5): p. 308-14.
72. Nagel, J., et al., *IgE synthesis in man. I. Development of specific IgE antibodies after immunization with tetanus-diphtheria (Td) toxoids*. J Immunol, 1977. **118**(1): p. 334-41.
73. Hammad, H., et al., *Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen*. J Exp Med. **207**(10): p. 2097-111.
74. Lindblad, E.B., *Aluminium compounds for use in vaccines*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 497-505.
75. Herbert, W.J., *The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice*. Immunology, 1968. **14**(3): p. 301-18.
76. Aucouturier, J., L. Dupuis, and V. Ganne, *Adjuvants designed for veterinary and human vaccines*. Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2666-72.
77. Podda, A. and G. Del Giudice, *MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile*. Expert Rev Vaccines, 2003. **2**(2): p. 197-203.
78. Jansen, T., et al., *Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants*. Vaccine, 2006. **24**(26): p. 5400-5.
79. O'Hagan, D.T., *MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 699-710.
80. O'Hagan, D.T., A. Wack, and A. Podda, *MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant for flu vaccines in humans: what did we learn during its development?* Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(6): p. 740-4.
81. Schultze, V., et al., *Safety of MF59 adjuvant*. Vaccine, 2008. **26**(26): p. 3209-22.
82. Wadman, M., *Race is on for flu vaccine*. Nature, 2005. **438**(7064): p. 23.
83. Straus, S.E., et al., *Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial*. J Infect Dis, 1997. **176**(5): p. 1129-34.
84. Heineman, T.C., et al., *A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant*. Vaccine, 1999. **17**(22): p. 2769-78.
85. McFarland, E.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120-specific antibodies in neonates receiving an HIV-1 recombinant gp120 vaccine*. J Infect Dis, 2001. **184**(10): p. 1331-5.

86. Perez, O. and A.M. Harandi, *4th International Workshop in Vaccine Adjuvants and Parasitic Vaccines (adjuvant 2008)*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(8): p. 1151-3.
87. Kersten, G.F. and D.J. Crommelin, *Liposomes and ISCOMs*. Vaccine, 2003. **21**(9-10): p. 915-20.
88. Kersten, G.F. and D.J. Crommelin, *Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 117-38.
89. Demana, P.H., et al., *Effect of incorporation of the adjuvant Quil A on structure and immune stimulatory capacity of liposomes*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 547-54.
90. Ribi, E., *Beneficial modification of the endotoxin molecule*. J Biol Response Mod, 1984. **3**(1): p. 1-9.
91. Qureshi, N., et al., *Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of Salmonella minnesota R595. Purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination*. J Biol Chem, 1985. **260**(9): p. 5271-8.
92. Ishikawa, Y., et al., *Establishment of lipopolysaccharide-dependent nuclear factor kappa B activation in a cell-free system*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 4158-64.
93. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 659-68.
94. Moore, A., L. McCarthy, and K.H. Mills, *The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1*. Vaccine, 1999. **17**(20-21): p. 2517-27.
95. Oleszek, W.A., *Chromatographic determination of plant saponins*. J Chromatogr A, 2002. **967**(1): p. 147-62.
96. Hostettmann, K. and A. Marston, *Saponins. Chemistry & pharmacology of natural products*. Cambridge University Press. 548 pp., 1995.
97. Haralampidis, K., M. Trojanowska, and A.E. Osbourn, *Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002. **75**: p. 31-49.
98. Abe, I., M. Rohmer, and G. Prestwich, *Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes*. Chem rev, 1993. **93**: p. 2189-206.
99. Francis, G., et al., *The biological action of saponins in animal systems: a review*. Br J Nutr, 2002. **88**(6): p. 587-605.
100. Price, K.R., I.T. Johnson, and G.R. Fenwick, *The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1987. **26**: p. 27-135.
101. Sidhu, G. and D. Oakenfull, *A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins*. British Journal of Nutrition, 1986. **55**: p. 643-649.
102. Cleland, J.L., et al., *Isomerization and formulation stability of the vaccine adjuvant QS-21*. J Pharm Sci, 1996. **85**(1): p. 22-8.
103. Oakenfull, D., *Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution*. Aust. J. Chem., 1986. **39**: p. 1671-1683.
104. Lacaille-Dubois, M.A., *Biologically and pharmacologically active saponins from plants: recent advances. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants*. . Proceedings of the phitochemical society of Europe., 2000: p. 205-218.

105. Ferreira, F. and J. Llodra, *Glycoside based adjuvants. Biologically and pharmacologically active saponins from plants: recent advances. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants.* Proceedings of the phitochemical society of Europe., 2000: p. 233-240.
106. Sparg, S.G., M.E. Light, and J. van Staden, *Biological activities and distribution of plant saponins.* J Ethnopharmacol, 2004. **94**(2-3): p. 219-43.
107. Sautour, M., T. Miyamoto, and M.A. Lacaille-Dubois, *Bioactive steroidal saponins from Smilax medica.* Planta Med, 2006. **72**(7): p. 667-70.
108. Grenby, T.H., *Intense sweeteners for the food industry: an overview.* Trends Food Sci Technol, 1991. **2**: p. 2-6.
109. Heng, L., et al., *Bitterness of saponins and their content in dry peas.* J Sci Food Agric, 2006. **86**: p. 1225-31.
110. Oda, K., et al., *Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants.* Biol Chem, 2000. **381**(1): p. 67-74.
111. Gauthier, C., et al., *Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins.* Bioorg Med Chem, 2009. **17**(5): p. 2002-8.
112. 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): p. 243-54.
113. Dalsgaard, K., M.H. Jensen, and K.J. Sorensen, *Saponin adjuvants. IV. Evaluation of the adjuvant quil A in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease.* Acta Vet Scand, 1977. **18**(3): p. 349-60.
114. Dalsgaard, K. and M.H. Jensen, *Saponin adjuvants. VI. The adjuvant activity of quil A in trivalent vaccination of cattle and guinea pigs against foot-and-mouth disease.* Acta Vet Scand, 1977. **18**(3): p. 367-73.
115. Sun, H.X., Y. Xie, and Y.P. Ye, *Advances in saponin-based adjuvants.* Vaccine, 2009. **27**(12): p. 1787-96.
116. Kensil, C.R., et al., *Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex.* J Immunol, 1991. **146**(2): p. 431-7.
117. Soltysik, S., et al., *Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function.* Vaccine, 1995. **13**(15): p. 1403-10.
118. Sun, Y., et al., *Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of Pulsatilla chinensis with less adverse reactions.* Int Immunopharmacol, 2010. **10**(5): p. 584-90.
119. Takahashi, H., et al., *Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs.* Nature, 1990. **344**(6269): p. 873-5.
120. Kensil, C.R., J.Y. Wu, and S. Soltysik, *Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21.* Pharm Biotechnol, 1995. **6**: p. 525-41.
121. Villacres-Eriksson, M., et al., *Involvement of interleukin-2 and interferon-gamma in the immune response induced by influenza virus iscoms.* Scand J Immunol, 1992. **36**(3): p. 421-6.
122. Villacres-Eriksson, M., et al., *Immunomodulation by Quillaja saponaria adjuvant formulations: in vivo stimulation of interleukin 12 and its effects on the antibody response.* Cytokine, 1997. **9**(2): p. 73-82.

123. Sun, H.X., *Adjuvant effect of Achyranthes bidentata saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice*. Vaccine, 2006. **24**(17): p. 3432-9.
124. Sun, Y., M. Li, and J. Liu, *Haemolytic activities and adjuvant effect of Anemone raddeana saponins (ARS) on the immune responses to ovalbumin in mice*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(8): p. 1095-102.
125. Yang, Z.G., H.X. Sun, and W.H. Fang, *Haemolytic activities and adjuvant effect of Astragalus membranaceus saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice*. Vaccine, 2005. **23**(44): p. 5196-203.
126. Kong, X., et al., *Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(7): p. 975-82.
127. Yesilada, E., et al., *Effects of triterpene saponins from Astragalus species on in vitro cytokine release*. J Ethnopharmacol, 2005. **96**(1-2): p. 71-7.
128. Estrada, A., B. Li, and B. Laarveld, *Adjuvant action of Chenopodium quinoa saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1998. **21**(3): p. 225-36.
129. Dai, J.H., et al., *Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages*. Immunology, 2001. **103**(2): p. 235-43.
130. Sun, H.X. and H.J. Pan, *Immunological adjuvant effect of Glycyrrhiza uralensis saponins on the immune responses to ovalbumin in mice*. Vaccine, 2006. **24**(11): p. 1914-20.
131. Zhang, C., X. Yang, and L. Xu, *[Immunomodulatory action of the total saponin of Gynostemma pentaphylla]*. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 1990. **10**(2): p. 96-8, 69-70.
132. Sun, H. and Q. Zheng, *Haemolytic activities and adjuvant effect of Gynostemma pentaphyllum saponins on the immune responses to ovalbumin in mice*. Phytother Res, 2005. **19**(10): p. 895-900.
133. Matsuda, H., et al., *Bioactive saponins and glycosides. XIV. Structure elucidation and immunological adjuvant activity of novel protojubilogenin type triterpene bisdesmosides, protojubilosides A, B, and B1, from the seeds of Zizyphus jujuba var. spinosa (Zizyphi Spinosi Semen)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1999. **47**(12): p. 1744-8.
134. Tezuka, Y., et al., *Kinmoonosides A-C, three new cytotoxic saponins from the fruits of Acacia concinna, a medicinal plant collected in myanmar*. J Nat Prod, 2000. **63**(12): p. 1658-64.
135. Kukhetpitakwong, R., et al., *Immunological adjuvant activities of saponin extracts from the pods of Acacia concinna*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(11): p. 1729-35.
136. Yoshikawa, M., et al., *Medicinal foodstuffs. XII. Saponin constituents with adjuvant activity from hyacinth bean, the seeds of Dolichos lablab L. (1): Structures of lablabosides A, B, and C*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1998. **46**(5): p. 812-6.
137. Santos, W.R., et al., *Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of Periandra mediterranea saponin on the humoral response to the FML antigen of Leishmania donovani*. Vaccine, 1997. **15**(9): p. 1024-9.
138. Nico, D., et al., *Assessment of the monoterpene, glycidic and triterpene-moieties' contributions to the adjuvant function of the CP05 saponin of Calliandra*

- pulcherrima* Benth during vaccination against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 2007. **25**(4): p. 649-58.
139. Fleck, J.D., et al., *Adjuvant activity of Quillaja brasiliensis saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice*. *Vaccine*, 2006. **24**(49-50): p. 7129-34.
140. Kumazawa, Y., et al., *Activation of murine peritoneal macrophages by saikosaponin a, saikosaponin d and saikogenin d*. *Int J Immunopharmacol*, 1989. **11**(1): p. 21-8.
141. Ushio, Y. and H. Abe, *The effects of saikosaponin on macrophage functions and lymphocyte proliferation*. *Planta Med*, 1991. **57**(6): p. 511-4.
142. Finkelman, F.D., et al., *Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection*. *Annu Rev Immunol*, 1990. **8**: p. 303-33.
143. Bomford, R., et al., *Adjuvant activity and ISCOM formation by structurally diverse saponins*. *Vaccine*, 1992. **10**(9): p. 572-7.
144. Krivorutchenko, Y.L., et al., *Study of the adjuvant activity of new MDP derivatives and purified saponins and their influence on HIV-1 replication in vitro*. *Vaccine*, 1997. **15**(12-13): p. 1479-86.
145. Bangham, A.D., et al., *Action of saponin on biological cell membranes*. *Nature*, 1962. **196**: p. 952-5.
146. Takechi, M. and Y. Tanaka, *Haemolytic time course differences between steroid and triterpenoid saponins*. *Planta Med*, 1995. **61**(1): p. 76-7.
147. Takechi, M., S. Shimada, and Y. Tanaka, *Time course and inhibition of saponin-induced hemolysis*. *Planta Med*, 1992. **58**(2): p. 128-30.
148. Segal, R., et al., *Effect of ester groups on the haemolytic action of saponins. II. Esterification with bifunctional acids*. *Biochem Pharmacol*, 1970. **19**(8): p. 2501-7.
149. Segal, R., M. Mansour, and D.V. Zaitschek, *Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and saponins*. *Biochem Pharmacol*, 1966. **15**(10): p. 1411-6.
150. Segal, R., P. Shatkovsky, and I. Milo-Goldzweig, *On the mechanism of saponin hemolysis--I. Hydrolysis of the glycosidic bond*. *Biochem Pharmacol*, 1974. **23**(5): p. 973-81.
151. Matsuda, H., et al., *Effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals*. *Biol Pharm Bull*, 1997. **20**(10): p. 1092-5.
152. Wang, Y., et al., *Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins*. *Bioorg Med Chem*, 2007. **15**(7): p. 2528-32.
153. Oliveira-Freitas, E., et al., *Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis*. *Vaccine*, 2006. **24**(18): p. 3909-20.
154. Sun, H.X., F. Qin, and Y.P. Ye, *Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng**. *Vaccine*, 2005. **23**(48-49): p. 5533-42.
155. Santos, W.R., et al., *Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis*. *Vaccine*, 2002. **21**(1-2): p. 30-43.
156. Jacobsen, N.E., et al., *Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by 1H and natural abundance 13C NMR spectroscopy*. *Carbohydr Res*, 1996. **280**(1): p. 1-14.

157. Copland, M.J., et al., *Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(2): p. 97-105.
158. Myschik, J., et al., *On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs*. Micron, 2006. **37**(8): p. 724-34.
159. Sun, H.X., Y. Xie, and Y.P. Ye, *ISCOMs and ISCOMATRIX*. Vaccine, 2009. **27**(33): p. 4388-401.
160. Rajanathanan, P., et al., *Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses*. Vaccine, 1999. **17**(7-8): p. 715-30.
161. Yang, Y.W., N.A. Sheikh, and W.J. Morrow, *The ultrastructure of tomatine adjuvant*. Biomaterials, 2002. **23**(23): p. 4677-86.
162. Peixoto, M.P., et al., *Wormlike micellar aggregates of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): a characterisation by cryo-TEM, rheology, light scattering and small-angle neutron scattering*. J Pharm Sci. **100**(2): p. 536-46.
163. Daines, A.M., et al., *Mannosylated saponins based on oleanolic and glycyrrhizic acids. Towards synthetic colloidal antigen delivery systems*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(14): p. 5207-18.
164. Kersten, G.F., et al., *On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms)*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1062**(2): p. 165-71.
165. Cox, J.C., A. Sjolander, and I.G. Barr, *ISCOMs and other saponin based adjuvants*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **32**(3): p. 247-271.
166. Skene, C.D. and P. Sutton, *Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use*. Methods, 2006. **40**(1): p. 53-9.
167. Lendemans, D.G., et al., *Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid*. J Pharm Sci, 2005. **94**(8): p. 1794-807.
168. Sambhara, S., et al., *Heterotypic protection against influenza by immunostimulating complexes is associated with the induction of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes*. J Infect Dis, 1998. **177**(5): p. 1266-74.
169. Sjolander, S., et al., *Intranasal immunisation with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses*. Vaccine, 2001. **19**(28-29): p. 4072-80.
170. Polakos, N.K., et al., *Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3589-98.
171. Verschoor, E.J., et al., *Comparison of immunity generated by nucleic acid-, MF59-, and ISCOM-formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in Rhesus macaques: evidence for viral clearance*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3292-300.
172. Agrawal, L., et al., *Generating neutralizing antibodies, Th1 response and MHC non restricted immunogenicity of HIV-I env and gag peptides in liposomes and ISCOMs with in-built adjuvanticity*. J Immune Based Ther Vaccines, 2003. **1**(1): p. 5.
173. Wyde, P.R., et al., *Use of cotton rats for preclinical evaluation of measles vaccines*. Vaccine, 2000. **19**(1): p. 42-53.
174. Stittelaar, K.J., et al., *Longevity of neutralizing antibody levels in macaques vaccinated with Quil A-adjuvanted measles vaccine candidates*. Vaccine, 2002. **21**(3-4): p. 155-7.
175. Hu, K.F., et al., *The immunostimulating complex (ISCOM) is an efficient mucosal delivery system for respiratory syncytial virus (RSV) envelope antigens*

- inducing high local and systemic antibody responses.* Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 235-43.
176. Regner, M., et al., *Safety and efficacy of immune-stimulating complex-based antigen delivery systems for neonatal immunisation against respiratory syncytial virus infection.* Microbes Infect, 2004. **6**(7): p. 666-75.
177. Dong-Ji, Z., et al., *Priming with Chlamydia trachomatis major outer membrane protein (MOMP) DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhances protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th1 cellular immune responses.* Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3074-8.
178. Igietseme, J.U. and A. Murdin, *Induction of protective immunity against Chlamydia trachomatis genital infection by a vaccine based on major outer membrane protein-lipophilic immune response-stimulating complexes.* Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6798-806.
179. Stewart, T.J., et al., *ISCOMATRIX adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines.* Vaccine, 2004. **22**(27-28): p. 3738-43.
180. Frazer, I.H., et al., *Phase I study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia.* Vaccine, 2004. **23**(2): p. 172-81.
181. Maraskovsky, E., et al., *NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2879-90.
182. Davis, I.D., et al., *Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10697-702.
183. Kool, M., et al., *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells.* J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 869-82.
184. Eisenbarth, S.C., et al., *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants.* Nature, 2008. **453**(7198): p. 1122-6.
185. Li, H., et al., *Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3.* J Immunol, 2008. **181**(1): p. 17-21.
186. Marichal, T., et al., *DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity.* Nat Med. **17**(8): p. 996-1002.
187. Rhodes, J., *Evidence for an intercellular covalent reaction essential in antigen-specific T cell activation.* J Immunol, 1989. **143**(5): p. 1482-9.
188. Hall, S.R. and J. Rhodes, *Schiff base-mediated co-stimulation primes the T-cell-receptor-dependent calcium signalling pathway in CD4 T cells.* Immunology, 2001. **104**(1): p. 50-7.
189. Kensil, C.R., *Saponins as vaccine adjuvants.* Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996. **13**(1-2): p. 1-55.
190. Liu, G., et al., *QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity.* Vaccine, 2002. **20**(21-22): p. 2808-15.
191. Oda, K., et al., *Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins.* Vaccine, 2003. **21**(17-18): p. 2145-51.
192. Kensil, C., et al., *Structure/function relationship on adjuvants from Quillaja saponaria Molina.* Vaccine, Vol. 92. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992. p.35-40., 1992.

193. Sun, H., Z. Yang, and Y. Ye, *Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of Panax notoginseng*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(1): p. 14-25.
194. Ronnberg, B., et al., *Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity*. Vaccine, 1997. **15**(17-18): p. 1820-6.
195. Windon, R.G., et al., *Induction of lymphocyte recruitment in the absence of a detectable immune response*. Vaccine, 2000. **19**(4-5): p. 572-8.
196. Smith, R.E., et al., *Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5536-46.
197. Villacres, M.C., et al., *Internalization of iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction*. Cell Immunol, 1998. **185**(1): p. 30-8.
198. Pearse, M.J. and D. Drane, *ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(3): p. 465-74.
199. Ackerman, A.L., et al., *Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12889-94.
200. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
201. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
202. van Binnendijk, R.S., et al., *Measles virus transmembrane fusion protein synthesized de novo or presented in immunostimulating complexes is endogenously processed for HLA class I- and class II-restricted cytotoxic T cell recognition*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 119-28.
203. Mahnke, K., et al., *The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 673-84.
204. Jiang, W., et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 151-5.
205. Coffman, R.L., D.A. Leberman, and P. Rothman, *Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 229-70.
206. Maloy, K.J., A.M. Donachie, and A.M. Mowat, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2835-41.
207. Sjolander, A., K.L. Bengtsson, and B. Morein, *Kinetics, localization and cytokine profile of T cell responses to immune stimulating complexes (iscoms) containing human influenza virus envelope glycoproteins*. Vaccine, 1997. **15**(9): p. 1030-8.
208. Villacres-Eriksson, M., *Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes*. Clin Exp Immunol, 1995. **102**(1): p. 46-52.
209. Sjolander, A., et al., *Kinetics, localization and isotype profile of antibody responses to immune stimulating complexes (iscoms) containing human influenza virus envelope glycoproteins*. Scand J Immunol, 1996. **43**(2): p. 164-72.

210. Lovgren, K., *The serum antibody response distributed in subclasses and isotypes after intranasal and subcutaneous immunization with influenza virus immunostimulating complexes*. Scand J Immunol, 1988. **27**(2): p. 241-5.
211. Rajesh, D., et al., *Th1 and Th17 immunocompetence in humanized NOD/SCID/IL2rgammanull mice*. Hum Immunol, 2010. **71**(6): p. 551-9.
212. Muller, K.M., et al., *Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5576-84.
213. Iwaki, M., et al., *Toxoid flocculation assay by laser light-scattering*. J Immunol Methods, 2007. **318**(1-2): p. 138-46.
214. Heck, C.I. and E.G. de Mejia, *Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations*. J Food Sci, 2007. **72**(9): p. R138-51.
215. Vargas, A.J., et al., *Passiflora alata and Passiflora edulis spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy*. Fitoterapia, 2007. **78**(2): p. 112-9.
216. Heinzmann, B. and E. Schenkel, *Saponins from Ilex dumosa*. J. Nat. Prod., 1995. **58**(9): p. 1419-1422.
217. Athayde, M., et al., *Triterpenes and saponins from Ilex argentina Leaves*. Acta Farm. Bonaerense, 2001. **20**(1): p. 13-6.
218. Gosmann, G. and E. Schenkel, *A new saponin from mate, Ilex paraguariensis*. Journal of natural products, 1989. **52**(6): p. 1367-1370.
219. Reginatto, F.H., et al., *Steroid and Triterpenoid Glucosides from Passiflora alata*. J. Braz. Chem. Soc., 2001. **12**(1): p. 32-36.
220. Kauffmann, C., et al., *Constituents from leaves of Quillaja brasiliensis*. Nat Prod Res, 2004. **18**(2): p. 153-7.
221. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
222. Freshney, I., *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 1992, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford. p. 329 pp.
223. Carrillo, B.J., et al., *Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina*. Zbl. Vet. Med, 1983. **B 30**: p. 327-332.
224. D'Arce, R.C., et al., *Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5*. Vet Microbiol, 2002. **88**(4): p. 315-24.
225. Bahnemann, H., et al., *Immunogenicity in cattle of foot-and mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine*. Bulletin Office of International Epizooties 1974. **81**: p. 1335-1343.
226. Beh, K.J., *Production and characterization of monoclonal antibodies specific for sheep IgG subclasses IgG1 or IgG2*. Vet Immunol Immunopathol, 1987. **14**(2): p. 187-96.
227. Varela, A.P., et al., *Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes*. Vet Microbiol. **142**(3-4): p. 254-60.
228. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
229. Gupta, R.K. and G.R. Siber, *Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid*. Biologicals, 1994. **22**(1): p. 53-63.

230. Haridas, V., et al., *Avicins: triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5821-6.
231. Zhu, J., et al., *Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(6): p. 1831-8.
232. Lee, M.S., et al., *Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(11): p. 1248-54.
233. Black, C.A., *Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective*. Dermatol Online J, 1999. **5**(1): p. 7.
234. Kamstrup, S., et al., *Preparation and characterisation of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A*. Vaccine, 2000. **18**(21): p. 2244-9.
235. Rimmelzwaan, G.F., et al., *Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 4): p. 757-65.
236. Morein, B., K.F. Hu, and I. Abusugra, *Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(10): p. 1367-82.
237. Demana, P.H., et al., *A comparison of pseudo-ternary diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by lipid-film hydration and dialysis*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(5): p. 573-80.
238. Silveira, F., et al., *Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from Ilex and Passiflora spp*. Phytother Res. 2011 Apr 8. doi: 10.1002/ptr.3454.
239. Pearse, M.J. and D. Drane, *ISCOMATRIX adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses*. Vaccine, 2004. **22**(19): p. 2391-5.
240. Hilgers, L.A., et al., *A novel non-mineral oil-based adjuvant. II. Efficacy of a synthetic sulfolipopopolysaccharide in a squalane-in-water emulsion in pigs*. Vaccine, 1994. **12**(7): p. 661-5.
241. Aucouturier, J., S. Ascarateil, and L. Dupuis, *The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 2**: p. S2-44-5.
242. Buonavoglia, D., et al., *Long-term immunogenicity and protection against Mycoplasma agalactiae induced by an oil adjuvant vaccine in sheep*. Res Vet Sci. **88**(1): p. 16-9.
243. Gupta, R.K., et al., *Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity*. Vaccine, 1993. **11**(3): p. 293-306.
244. Jackson, L.A. and J.P. Opdebeeck, *The effect of various adjuvants on the humoral immune response of sheep and cattle to soluble and membrane midgut antigens of Boophilus microplus*. Vet Parasitol, 1995. **58**(1-2): p. 129-41.
245. Harrison, G.B., et al., *Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant Taenia ovis vaccine formulated with saponin or selected adjuvants*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **70**(3-4): p. 161-72.